Versuche zur Bestimmung der endogenen Glucocorticoide im peripheren Rinderblut

Eduard Jordan

München
1971

Aus dem Institut für Physiologie
der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan
der Technischen Universität München

Direktor: Professor Dr. Heinrich Karg

Versuche zur Bestimmung der endogenen Glucocorticoide im peripheren Rinderblut

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Eduard Jordan
aus Freising

München 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. H. Karg
Korreferent: Prof. Dr. M. Rüsse

Tag der Promotion: 2.Juli 1971

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Literatur	1
1.1	Hormone der Nebennierenrinde	1
1.1.1	Chemische Struktur der Glucocorticoide	1
1.1.2	Biosynthese und Regelkreis der Glucocorticoide	3
1.1.3	Stoffwechsel der Glucocorticoide	7
1.1.3.1	Bedeutung der Plasmaproteine für das Stoffwechselgeschehen der Glucocorticoide	7
1.1.4	Beim Rind bisher nachgewiesene Glucocorticoide	10
1.1.5	Biologische Wirkungen der Glucocorticoide	12
1.1.5.1	Stellung der Glucocorticoide im Stoffwechselgeschehen und bei Stresssituationen	12
1.1.5.2	Einfluß der Glucocorticoide auf das lymphatische System	13
1.1.5.3	Glucocorticoide bei der Einleitung der Geburt	14
2.	Methoden und methodische Untersuchungen zur Bestimmung der Glucocorticoide	18
2.1	Grundsätzliche Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung von Glucocorticoiden	18
2.1.1	Die colorimetrischen Verfahren	19
2.1.1.1	Die Tetrazoliumblau-Farbreaktion	19
2.1.1.2	Die Porter-Silber Farbreaktion	19
2.1.1.3	Die Zimmermannreaktion	20
2.1.2	Die Fluoreszenzmethoden	20
2.1.2.1	Die Alkalifluoreszenz	21
2.1.2.2	Die Säurefluoreszenz	21
2.1.2.3	Die Fluoreszenzauslöschmethode	21
2.1.3	Die UV-Messung	22
2.1.4	Die gaschromatographischen Verfahren	22

		Seite
2.1.5	Die Doppelisotopenderivatenverdünnungs-methode	23
2.1.6	Die Proteinbindungsmethoden und der Radio-immunotest	24
2.2	Eigene Versuche zur Bestimmung von Cortisol und Corticosteron im peripheren Rinderblut mit colorimetrischen Methoden	24
2.2.1	Gemeinsamer Aufarbeitungsgang	25
2.2.1.1	Materialien und Reagentien	25
2.2.1.2	Gewinnung der Blutproben	26
2.2.1.3	Interne Standardisierung und Extraktionsgang	26
2.2.1.4	Bestimmung des Aufarbeitungsverlustes	28
2.2.2	Versuche mit der Tetrazoliumblau-Farbreaktion	29
2.2.2.1	Durchführung der Farbreaktion	29
2.2.2.2	Überprüfung der Methode	30
2.2.2.2.1	Ergebnisse der Tetrazoliumblau-Farbreaktion nach Anwendung des vorgesehenen Aufarbeitungs-ganges	30
2.2.2.2.2	Ergebnisse der Tetrazoliumblau-Farbreaktion nach Anfügung weiterer Reinigungsschritte	31
2.2.3	Versuche mit der Porter-Silber Farbreaktion	33
2.2.3.1	Durchführung der Farbreaktion	33
2.2.3.2	Überprüfung der Methode	35
2.2.3.2.1	Ergebnisse der Porter-Silber Reaktion nach Anwendung des vorgesehenen Aufarbeitungsganges	35
2.2.3.2.2	Ergebnisse der Porter-Silber Reaktion nach Anfügung weiterer Reinigungsstufen	35
2.2.3.2.3	Ergebnisse der Porter-Silber Reaktion mit biologischem Material, das nicht papierchromato-graphisch gereinigt wurde	36
2.2.4	Beurteilung der colorimetrischen Messungen	37
2.2.4.1	Die Beurteilung der Tetrazoliumblau-Farbreak-tion	37

		Seite
2.2.4.2	Die Beurteilung der Porter-Silber Farbreaktion	39
2.3	Eigene Versuche zur Bestimmung von Cortisol und Corticosteron im peripheren Rinderblut mit einer Proteinbindungsmethode	40
2.3.1	Theoretische Grundlagen der Proteinbindungsreaktion	40
2.3.1.1	Die spezifisch steroidbindenden Plasmafraktionen Transcortin und "Sex Steroid bindendes Plasmaprotein"	41
2.3.1.2	Die Entwicklung der Proteinbindungsreaktion	43
2.3.2	Durchführung der Proteinbindungsreaktion	47
2.3.2.1	Materialien und Reagentien	47
2.3.2.2	Ansatz der Transcortinlösung	49
2.3.2.3	Durchführung der Proteinbindungsreaktion mit Florisil als Adsorbens	52
2.3.2.4	Durchführung der Proteinbindungsreaktion mit Kohle als Adsorbens	53
2.3.2.5	Vergleich der beiden Verfahren	57
2.3.3	Vorversuche zur Entwicklung eines Extraktions- und Reinigungsverfahrens für Plasmacortisol und -corticosteron	59
2.3.3.1	Extraktion und Dünnschichtchromatographie	60
2.3.3.2	Interne Standardisierung	61
2.3.3.3	Anwendung der beschriebenen Methode bei biologischem Material	63
2.3.4	Die Überprüfung des vorgesehenen Aufarbeitungsganges	64
2.3.4.1	Überprüfung des Reagentienleerwertes und Reinigung des Extraktionsmittels	64
2.3.4.2	Überprüfung der Methode durch Zusatzversuche und die besondere Behandlung des Kieselgels	66
2.3.4.3	Überprüfung der Methode durch Extraktion gesteigerter Plasmamengen	69
2.3.4.4	Beurteilung der Methode	71

		Seite
2.3.5	Endgültiges Verfahren zur spezifischen Bestimmung von Corticosteron	73
2.3.6	Verfahren zur Messung der "Gesamtcorticoide"	74
2.3.6.1	Definition der "Gesamtcorticoide"	74
2.3.6.2	Aufarbeitungsgang und Durchführung der Proteinbindungsreaktion zur Bestimmung der "Gesamtcorticoide"	75
2.3.6.3	Charakterisierung des Verfahrens zur Bestimmung der "Gesamtcorticoide"	76
3.	Anwendung der Proteinbindungsmethode zur Bestimmung der Glucocorticoide im Rinderplasma	79
3.1	Tiermaterial	79
3.2	Allgemeine Plasmawerte von Rindern mit und ohne Stresseinfluß	79
3.3	Glucocorticoide um den Geburtszeitpunkt am Beispiel der Kuh "Zilla"	81
3.4	Veränderung des Glucocorticoidspiegels nach Verabreichung von ACTH	81
4.	Diskussion	85
4.1	Diskussion der Methodik	85
4.2	Diskussion der Ergebnisse	89
5.	Zusammenfassung	91
	Summary	93
6.	Literaturverzeichnis	95

1. L I T E R A T U R

1.1. Hormone der Nebennierenrinde

1.1.1 Chemische Struktur der Glucocorticoide

Die Glucocorticoide gehören zur großen Gruppe der Steroidhormone, die sich in ihrer chemischen Grundstruktur vom Steran (Cyclopentano-perhydrophenanthren) herleiten. Durch die Zahl der C-Atome lassen sich die Steroidhormone in drei Gruppen einteilen.

So sind a) die Östrogene durch 18 C-Atome
b) die Androgene durch 19 C-Atome
c) die Gestagene und Corticoide durch 21 C-Atome

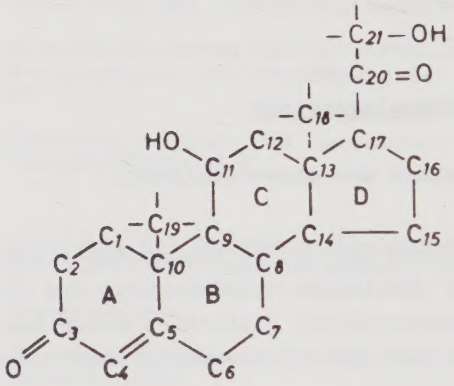
gekennzeichnet (KARLSON, 1970).

Der unterschiedliche chemische Aufbau in der Anordnung und Zahl der reaktiven Gruppen, Sättigung des Ringsystems und Seitenketten bedingen jeweils die biologische Wirkung (JUNKMANN u. WITZEL, 1963).

Die Nebennierenrindenhormone im engeren Sinne lassen sich ihrer Hauptfunktion nach in zwei Gruppen einteilen: in die Glucocorticoide und Mineralocorticoide. Die physiologisch wichtigsten Glucocorticoide sind das Cortisol und das Corticosteron (GANONG, 1965; McDONALD, 1969).

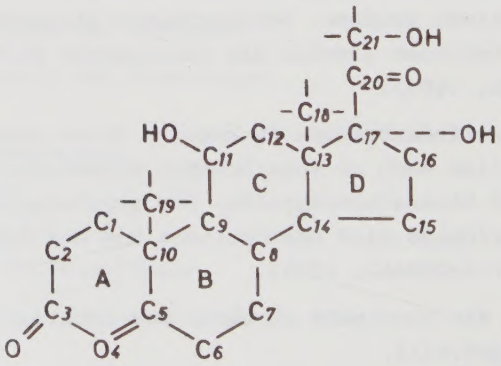
In Abb. 1 ist die chemische Struktur des Corticosterons und Cortisols dargestellt.

Abb. 1. Struktur des Corticosterons und Cortisols (Numerierung der Kohlenstoffatome und Bezeichnung der Ringe).



Corticosteron

(11β, 21 - Dihydroxypregn - 4 - en - 3,20 - dion)



Cortisol

(11β, 17α, 21 - Trihydroxypregn - 4 - en - 3,20 - dion)

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, unterscheiden sich Corticosteron (Summenformel: $C_{21}H_{30}O_4$) und Cortisol (Summenformel: $C_{21}H_{30}O_5$) lediglich durch die Hydroxylgruppe am C_{17}-Atom. Weitere Bezeichnungen für Cortisol sind 17 α-Hydroxycorticosteron, Hydrocortison oder Kendall F. Als Synonyma für Corticosteron sind Kendall B und Reichstein H (REICHSTEIN, 1937) geläufig.

1.1.2. Biosynthese und Regelkreis der Glucocorticoide

In der Nebennierenrinde können praktisch alle Steroidhormone produziert werden. Charakteristisch ist jedoch für die Nebennierenrinde die Produktion von Corticoiden (TURNER, 1966). Der Biosyntheseweg der Glucocorticoide (KARLSON, 1970) ist in Abb. 2 dargestellt. Ausgangsmaterial ist das Acetyl-CoA (aktivierte Essigsäure), aus dem über eine Reihe von Vorstufen (Mevalonsäure, Isopentenyl-pyrophosphat, Farnesylpyrophosphat, Squalen, Lanosterin) das Cholesterin entsteht.

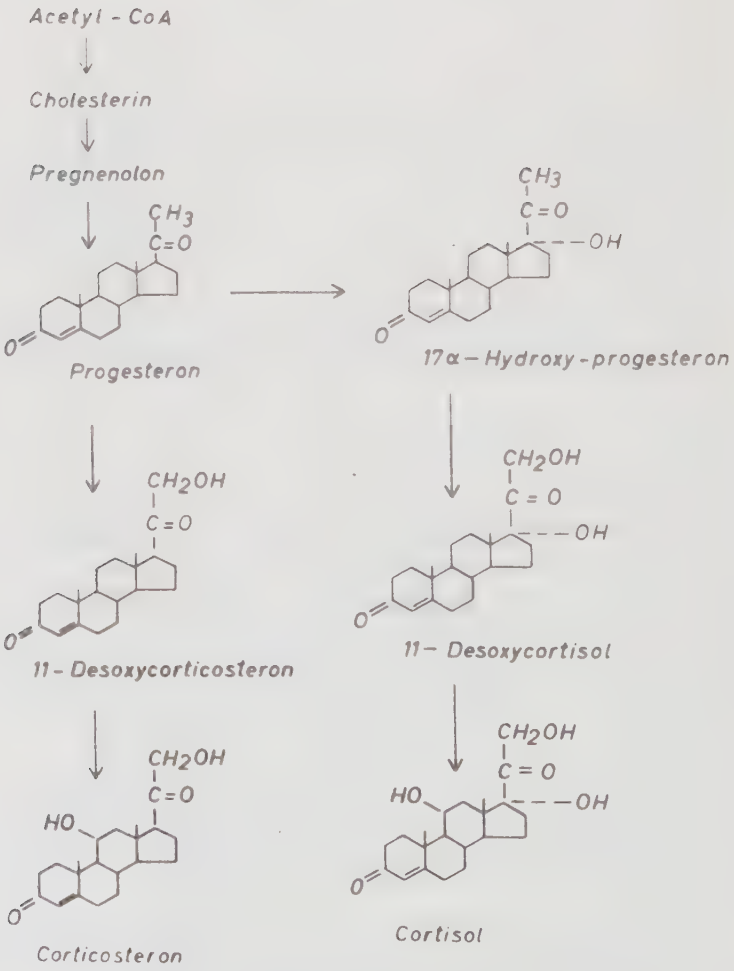
Findet eine 17-Hydroxylierung von Progesteron statt, so ergibt sich als Hauptprodukt der Glucocorticoidsynthese Cortisol, unterbleibt sie, so entsteht Corticosteron.

Bei allen bisher untersuchten Spezies wurde dieser Syntheseweg nachgewiesen (TURNER, 1966). Lediglich das Verhältnis in der Syntheserate Corticosteron zu Cortisol ist speziesabhängig. So ist z.B. beim Mensch Cortisol das vorherrschende Glucocorticoid, während beim Kaninchen, der Ratte, der Maus oder den Vögeln in erster Linie Corticosteron gebildet wird (TURNER, 1966; McDONALD, 1969).

Andere mögliche Synthesewege für die Glucocorticoide, d.h. nicht über die klassischen Vorstufen Cholesterin und Pregnenolon, erwägen LOMMER (1970) bzw. DIRSCHERL u. KADIB-ELBAN (1970) aufgrund von Inkubationsversuchen mit Rattennebennieren.

Die Zwischenprodukte der Glucocorticoidbiosynthese Pregnenolon und Progesteron sind wichtige Ausgangsprodukte der Biosynthese von Androgenen und Östrogenen (GANONG, 1965).

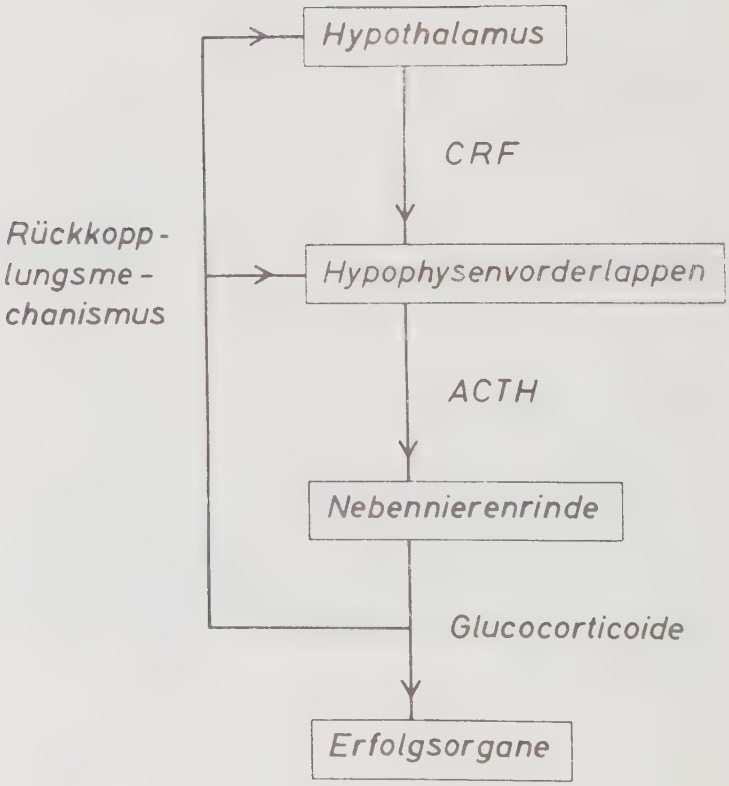
Abb. 2. Biosynthese der Glucocorticoide (KARLSON, 1970).



Daraus geht hervor, daß die Synthesewege der oben genannten Steroidgruppen eng miteinander verflochten sind.

Die Steuerung der Glucocorticoidproduktion und -sekretion in der Nebennierenrinde erfolgt über ein kompliziertes Regelsystem. Eine Übersicht über die endokrinen Steuerungssysteme geben TURNER (1966), KARG (1968, 1969) u. McDONALD (1969). Mit Hilfe dieses Regelsystems, wie es in Abb. 3 schematisch dargestellt ist, soll eine optimale Glucocorticoidkonzentration im Blut aufrecht erhalten werden. Die zwei Zentren der Steuerung der Glucocorticoidbiosynthese sind Hypothalamus und Hypophysenvorderlappen. Sinkt die biologisch aktive Glucocorticoidkonzentration im peripheren Blut (siehe auch Kap. 1.1.3.1), so wird dies durch Zentren im Hypothalamus registriert und mit der Freisetzung von "corticotropin releasing factor" (CRF) beantwortet. Diese Faktoren veranlassen ihrerseits wieder den Hypophysenvorderlappen zur Abgabe von "adrenocorticotropen Hormon" (ACTH), das in der Nebenniere sowohl die Synthese, als auch die Sekretion von Glucocorticoiden anregt. Die erhöhte Glucocorticoidkonzentration des Blutes wird vom Hypothalamus registriert, und die Sekretion von CRF vermindert. Es konnte jedoch beim Hund gezeigt werden, daß, zumindest durch das synthetische Glucocorticoid Dexamethason, eine ACTH-Ausschüttung der Adenohypophyse trotz Vorliegens von CRF gehemmt werden kann (L'AGE u. GONZALEZ-LUQUE, 1970). Demnach scheint der Rückkopplungsmechanismus nicht nur über den Hypothalamus, sondern auch direkt über den Hypophysenvorderlappen verlaufen zu können, wie dies auch von McDONALD (1969) u. GANONG (1965) in Betracht gezogen wird.

Abb. 3. Regelkreis der Glucocorticoide (nach KARG, 1969 u. Mc DONALD, 1969).



1.1.3 Stoffwechsel der Glucocorticoide

Die Verteilung der Glucocorticoide im Organismus erfolgt nach Abgabe in das venöse Blut der Nebennieren über die Blutbahn. Dem Blut kommen neben der Transportfunktion vielfältige Aufgaben im Stoffwechsel der Glucocorticoide zu. Zunächst werden die Glucocorticoide in freier, gelöster Form im Blut angetroffen. Diesem Anteil der Glucocorticoidfraktion wird die direkte biologische Wirkung zugesprochen. Im Gegensatz dazu kommen die Glucocorticoide, wie nachfolgend noch weiter erörtert werden wird, auch in einer mit Plasmaproteinen gebundenen Form vor. Schließlich befindet sich auch ein gewisser Teil der Glucocorticoide nach Konjugation an Glucuronsäure und Sulfaten in biologisch inaktiver Form im Blutkreislauf. Diese konjugierten Glucocorticoide werden weniger stark an Plasmaproteine gebunden (MURPHY, 1969 u. 1970 a). Die Konjugation findet hauptsächlich in der Leber statt (GANONG, 1965). Dadurch wird die Wasserlöslichkeit der Steroide erhöht, so daß diese leichter über die Niere ausgeschieden werden können. Etwa 10 % des Cortisols wird beim Menschen in der Leber zu 17-Ketosteroidderivaten katabolisiert und nach Konjugation mit Sulfat über den Urin ausgeschieden (GANONG, 1965).

1.1.3.1 Bedeutung der Plasmaproteine für das Stoffwechselgeschehen der Glucocorticoide

Wie in Kap. 2.3.1 noch näher dargestellt werden wird, binden bestimmte Plasmaproteinfraktionen Glucocorticoide. Neben Albumin zeigt besonders Transcortin - eine Globulinfraktion - eine spezifische Affinität zu den Glucocorticoiden.

TAIT u. BURSTEIN (1964) berichten, daß bei normaler Körpertemperatur 78 % des gesamten endogenen Plasmacortisols beim Menschen an Transcortin und 13 % an Plasmaalbumin gebunden sind, während nur 9 % in freier Form vorliegen.

Die physiologische Bedeutung der Bindung von Glucocorticoiden an Plasmaproteine ist noch nicht eindeutig geklärt. Neben der reinen Transportfunktion wird den Plasmaproteinen eine gewisse "Pufferwirkung" zugeschrieben, da die an Transcortin gebundenen Glucocorticoide biologisch nicht wirksam sind. Dies geht aus zahlreichen Versuchen hervor: MILLS et al.(1960) konnten nach Östrogenbehandlung gesunder Männer und Frauen eine Erhöhung des Plasmacortisols auf das zwei- bis sechsfache des Ausgangswertes verzeichnen. Der erwartete Abfall der eosinophilen Granulozyten blieb jedoch aus, da durch einen vorausgegangenen Anstieg der Bindungskapazität des Plasmas, der durch eine vermehrte Synthese von Transcortin verursacht wird (SANDBERG et al., 1966; MILLS, 1962), mehr Plasmacortisol gebunden wurde, so daß sich die Konzentration des freien Steroids nicht wesentlich änderte. Der entsprechende physiologische Vorgang findet sich am Ende der Schwangerschaft der Frau, wo bei einer erhöhten Östrogenausscheidung eine Steigerung der Bindungskapazität des Plasmas für Cortisol gefunden wurde (SLAUNWHITE u. SANDBERG, 1959; DOE et al., 1960; BOOTH et al., 1961; DOE et al., 1964; De MOOR et al., 1966; TRAPP u. WEST, 1969; ROSENTHAL et al., 1969; HOFFMANN u. WESTPHAL, 1969). Der direkte Nachweis für die biologische Inaktivität von Glucocorticoiden, die an Transcortin gebunden sind, konnte durch Verwendung isolierten Transcortins gebracht werden. SLAUNWHITE et al. (1962) erreichten eine vermehrte Ablagerung von Glykogen in der Leber adrenalektomierter Ratten durch Zufuhr von Cortisol. Wurde jedoch den Ratten Cortisol injiziert, das an gereinigtes Transcortin gebunden war, so blieb dieser Effekt aus. In ähnlicher Weise konnte gezeigt werden, daß durch die Bindung an Transcortin Cortisol vor reduzierenden Leberenzymen geschützt werden konnte (SANDBERG u. SLAUNWHITE, 1963).

Nachdem ein enger Zusammenhang zwischen den Plasmaproteinen und Glucocorticoiden aufgezeigt wurde, ist zum Verständnis der Stoffwechselvorgänge der Glucocorticoide eine möglichst

genaue Kenntnis der physiologischen Änderungen in den Konzentrationen der Bindungsproteine erforderlich.

Auf die Zunahme der Bindungskapazität des Blutes für Glucocorticoide im Verlauf der Gravidität, die allein auf einer Erhöhung der Transcortinkonzentration beruht (siehe S. 8), wurde bereits hingewiesen. Dies trifft aber nicht für alle Spezies zu, sondern wurde bisher nur beim Menschen und Meerschweinchen beobachtet. Eine Steigerung der Transcortinkonzentration konnte bei Hund und Schaf weder durch Zufuhr von Östrogenen, noch im Verlauf der Gravidität beobachtet werden (LINDNER, 1964; PATERSON u. HILLS, 1967; SLAUNWHITE u. SANDBERG, 1970).

De MOOR et al.(1962) berichteten erstmals, daß die Bindungsaktivität des Serums beim erwachsenen Menschen, im Vergleich zu menschlichen Foeten, mehr als doppelt so groß ist. Auch bei neugeborenen Kindern wurden niedrigere Bindungskapazitäten als beim Erwachsenen gefunden (SANDBERG u. SLAUNWHITE, 1959; MILLS et al., 1959; SANDBERG et al., 1966). GALA u. WESTPHAL (1965) stellten bei der wachsenden Ratte einen kontinuierlichen Anstieg der Bindungskapazitäten mit dem Alter fest, wobei gleichzeitig, im Gegensatz zum Menschen (RACADOT et al., 1969), ein deutlicher Geschlechtsunterschied in Erscheinung trat. Im Alter von 48 Tagen wiesen weibliche Ratten doppelt so hohe Bindungsaktivitäten auf, wie die männlichen Tiere. So lag, trotz einer hohen Corticosteronkonzentration von durchschnittlich 27,4 µg/100 ml Serum bei den weiblichen Ratten und einer vergleichsweise niedrigen von 8,5 µg/100 ml Serum bei den männlichen Tieren, bei beiden Geschlechtern die Konzentration von nicht an Protein gebundenem Corticosteron übereinstimmend bei 0,39 und 0,33 µg/100 ml Serum (GALA u. WESTPHAL, 1965). Diese Angaben stellen Mittelwerte von jeweils mehr als 30 Einzelbestimmungen dar. Hervorzuheben ist, daß die Ratten bei der Blutabnahme nicht unter Stresseinfluß standen.

LINDNER (1964) verglich die Bindungseigenschaften menschlichen Plasmas mit dem anderer Spezies. Er stellte fest, daß mit abnehmenden Konzentrationen an Plasmacortisol auch die Bindungskapazität des Plasmas für Cortisol nachließ. Bei den Wiederkäuern, wo die niedrigsten Cortisolwerte gemessen wurden (Schaf: 0,4 bis 1,4 - Ziege: 1,2 - Rind: 2,6 µg Cortisol/100 ml Plasma), wurde auch die geringste Bindungskapazität für Cortisol festgestellt. Die Tatsache, daß im Plasma von Ziege, Schaf und Rind im Vergleich zum Menschen viel geringere Bindungskapazitäten für Cortisol vorhanden sind, wurde auch von anderen Autoren bestätigt.(SEAL u. DOE, 1966; PATERSON u. HILLS, 1967; TRAPP u. WEST, 1969). Aus der biologischen Inaktivität der an Proteine gebundenen Steroide erklärt sich auch die Beobachtung, daß bei den Spezies bzw. Individuen, die einen hohen Transcortingehalt des Blutes aufweisen, die biologische Halbwertszeit von Cortisol größer ist als bei denen, die nur eine geringe Transcortinkonzentration aufweisen (MILLS et al., 1960; MILLS, 1962; SAMUELS, 1966; PATERSON, 1964; DIXON et al., 1970).

1.1.4. Beim Rind bisher nachgewiesene Glucocorticoide

Aus der Zusammenstellung von DORFMAN u. UNGAR (1965) geht hervor, daß aus Rindernebennieren bisher 34 verschiedene C_{21}-Steroide isoliert wurden. Darunter befinden sich neben den hauptsächlichen Glucocorticoiden Cortisol und Corticosteron auch 11-Desoxycorticosteron, 11-Desoxycortisol, 11-Dehydrocorticosteron und Cortison. Während 11-Desoxycorticosteron und 11-Desoxycortisol Zwischenprodukte der Glucocorticoidbiosynthese darstellen (siehe Abb. 1), sind Cortison und 11-Dehydrocorticosteron Metaboliten im Glucocorticoidabbau (JUNKMANN, 1961; GANONG, 1965). Unter den übrigen 28 C_{21}-Steroiden befinden sich auch die Gestagene Progesteron und 17-Hydroxyprogesteron.

Im Gegensatz zu der großen Anzahl an Corticoiden, die in der Nebenniere gefunden wurden, konnten im Blut des Rindes lediglich die Hauptglucocorticoide Cortisol und Corticosteron eindeutig identifiziert werden (ESTERGREEN u. VENKATASESHU, 1967).

Wie in Kap. 1.1.2 bereits festgestellt wurde, ist das Verhältnis der Sekretionsrate Corticosteron zu Cortisol speziesabhängig. Beim Rind liegen nur wenige Ergebnisse darüber vor. Die erste Mitteilung stammt von HECHTER et al. (1951), die bei Perfusionsstudien an 4 Rindernebennieren ein Corticosteron zu Cortisolverhältnis von etwa 1 : 1 feststellten, das sich auch unter ACTH nicht änderte. BALFOUR et al. (1959) geben für Kälber Verhältniszahlen von 1 : 1,4 bis 1 : 15,4 an.

Aus den Ergebnissen von Cortisol- und Corticosteronbestimmungen im peripheren Plasma von 28 Bullen im Alter von 3 Monaten bis 12 Jahren, die von RIEGLE u. NELLOR (1967) durchgeführt wurden, läßt sich ein Mittelwert im Corticosteron zu Cortisolverhältnis von etwa 1 : 3 berechnen. WHIPP et al. (1967) untersuchten die Sekretionsrate der Nebennieren bei 5 Kälbern, die unter ACTH-Infusion standen, und stellten im Mittel ein Verhältnis von 1 : 5,8 fest. ESTERGREEN u. VENKATASESHU (1967) geben Corticosteron zu Cortisolverhältnisse im peripheren Rinderplasma (18 Kühe) zwischen 1 : 0,85 und 1 : 5,94 an.

Die Glucocorticoidkonzentrationen im peripheren Blut des Rindes wurden bisher von verhältnismäßig wenigen Arbeitsgruppen untersucht. Die meisten Autoren bestimmten die 17-Hydroxycorticosteroide des Plasmas mit Hilfe der Porter-Silber Reaktion (siehe Kap. 2.1.1.2). Mit dieser Methode wurden Werte zwischen 5 und 100 ng Porter-Silber positive Chromogene/1,0 ml Plasma gefunden, wobei die höheren Werte überwogen (ROBERTSON u. MIXNER, 1956; PATERSON, 1957; BRUSH, 1958; SHAW et al., 1960; SHAW u. NICHOLS, 1962 u. 1963; HEYNDRICKX, 1962; RIEGLE u. NELLOR, 1967). Von RIEGLE u. NELLOR (1967) wurde versucht, Corticosteron im peripheren Blut des Rindes mit einem colorimetrischen Verfahren zu messen. Diese Autoren geben bei Bullen eine mittlere Konzentration von 9,5 ng Corticosteron/ml Plasma mittels der Tetrazoliumblau-Farbreaktion (siehe Kap. 2.1.1.1) an.

Im Gegensatz zu den colorimetrischen Methoden wurden mit fluorimetrischen Verfahren im allgemeinen niedrigere Glucocorticoidkonzentrationen gemessen. So berichtet LINDNER (1964) über Cortisolwerte von etwa 26 ng/ml Plasma, während SABA (1964) lediglich eine Konzentration um 5 ng/ml Plasma messen konnte. ESTERGREEN u. VENKATASESHU (1967) fanden bei UV-Messungen Corticosteron- und Cortisolkonzentrationen von 15 bis 51 ng/ml Plasma bzw. 32 bis 131 ng/ml Plasma (siehe auch Kap. 2.2.2.2.1). Die niedrigsten Corticoidkonzentrationen erbrachte allerdings die Anwendung von Proteinbindungsmethoden für die Analyse der "Gesamtglucocorticoide" beim Rind. WAGNER (1970) fand bei Kühen Corticoidkonzentrationen von 4,5 bis 9,4 ng/ml Plasma. HEITZMANN, ADAMS u. HUNTER (1970) bzw. HEITZMANN, BAIRD u. MATHER (1970) geben Corticoidwerte von 3 bis 13,5 ng/ml Plasma bei Kühen an. In einem ähnlichen Größenbereich liegen auch die Messungen von WHIPP u. LYON (1970). Diese Autoren berichten über Corticoidwerte von 7 $\pm$ 4 ng/ml Plasma bei Kälbern und 4 $\pm$ 3 ng/ml Plasma bei Kühen.

1.1.5 Biologische Wirkungen der Glucocorticoide

1.1.5.1 Stellung der Glucocorticoide im Stoffwechselgeschehen und bei Stresssituationen

Die Hauptwirkung der Glucocorticoide ist mit den Begriffen "Glycogenese" und "Gluconeogenese" am besten beschrieben (GANONG, 1965). Dies bedeutet u.a. Neubildung von Kohlenhydraten aus Zwischenprodukten des Protein- und Fettstoffwechsels (KOLB, 1967). Die bekannte katabole Wirkung der Glucocorticoide ist darauf zurückzuführen (JUNKMANN u. WITZEL, 1963). Die genannten Stoffwechselvorgänge vollziehen sich in der Leber. Sie führen zu einem Anstieg der Glucosekonzentration im Blut, so daß dadurch die Glucocorti-

coide als Antagonisten von Insulin in Erscheinung treten.

Eine besondere Aufgabe fällt den Glucocorticoiden bei der Reaktion auf Stresseinflüsse zu. Ein Stress bewirkt über eine vermehrte ACTH-Ausschüttung einen Anstieg der Glucocorticoide im Blut. Dieser Anstieg erweist sich bei Stresssituationen als lebensnotwendig, da gezeigt werden konnte, daß adrenalektomierte Tiere nicht bzw. nur nach exogener Glucocorticoidzufuhr überlebten (GANONG, 1965). Der genaue Mechanismus dieser Glucocorticoidwirkung, die es dem Organismus ermöglicht, sich bestimmten Umweltveränderungen anzupassen, ist noch nicht geklärt (GANONG, 1965).

1.1.5.2. Einfluß der Glucocorticoide auf das lymphatische System

Von den zahlreichen Wirkungen auf verschiedene Organe des Körpers soll nur der Einfluß der Glucocorticoide auf das lymphatische System erwähnt werden. So ist es bekannt, daß durch Glucocorticoide die Aktivität lymphatischer Organe verändert und z.B. eine Abnahme der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut hervorgerufen wird (TURNER, 1966). Diese Wirkung der Glucocorticoide wird therapeutisch zur Beeinflussung entzündlicher Prozesse, zur Unterdrückung von allergischen Erscheinungen und zur Immunsuppression angewandt (KUSCHINSKY u. LÜLLMANN, 1967). Andererseits kann die Änderung der Konzentration der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut zum Nachweis der biologischen Aktivität der Glucocorticoide herangezogen werden (THORN et al., 1948).

1.1.5.3 Glucocorticoide bei der Einleitung der Geburt

Erst in neuerer Zeit wurde erkannt, daß den Glucocorticoiden bei verschiedenen Spezies eine wichtige Rolle bei der Einleitung des Geburtsgeschehens zukommt. So haben erste Untersuchungen bei Schafen gezeigt, daß nach Verabreichung von ACTH oder Glucocorticoiden an Foeten "in utero" innerhalb von 2 bis 7 Tagen die Geburt ausgelöst werden kann (Van RENSBURG, 1966; HALLIDAY u. BUTTLE, 1968; LIGGINS, 1968). Die Ansicht, daß die Glucocorticoide eine aktive Rolle bei der Auslösung der Geburt spielen, wurde auch durch schon länger beschriebene pathologisch-anatomische Befunde bestärkt. So hatten Van HEERDEN (1963) und Van RENSBURG (1963 u. 1965) bei habituell abortierenden Angoraziegen deutliche Nebennierenhyperplasien verbunden mit Thymusatrophien (Kap. 1.1.5.2) der Foeten festgestellt. Demgegenüber war in vielen Fällen bei genetisch bedingter Verlängerung der Tragezeit der Kuh eine gleichzeitige Nebenniereninsuffizienz des Kalbes beobachtet worden (HOLM et al., 1961). Eine Verlängerung der Gravidität bei Mißbildung des foetalen Kopfes scheint ebenfalls mit einer Störung des Nebennierenrinden-Hypophysensystems erklärt werden zu können. BINNS et al. (1962) beschrieben verlängerte Gravidität beim Schaf mit Cyklopie der Früchte. REA (1898) und MILIC u. ADAMSON (1969) beobachteten dasselbe bei anencephalen menschlichen Foeten.

Eine Verlängerung der Graviditätsdauer konnte auch experimentell hervorgerufen werden: LIGGINS et al. (1967), sowie DROST u. HOLM (1968) stellten nach Hypophys- oder Epinephrektomie an Schaffoeten "in utero" eine Verlängerung der Trächtigkeit über den physiologischen Geburtstermin hinaus fest.

Nach ADAMS (1969) kommt es bei Kühen aufgrund von Belastungen (z.B. Operation) im letzten Monat der Trächtigkeit nicht selten innerhalb von 2 - 3 Tagen zur Austreibung der Frucht. Demselben Autor gelang es mit Hilfe einer einzigen Injektion des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason (20 mg/Kuh) diese Beobachtung zu reproduzieren. Andere Arbeitsgruppen, die nach einmaliger parenteraler Anwendung des synthetischen Glucocorticoids Flumethason (5 - 10 mg/Kuh) am Muttertier ebenfalls eine vorzeitige Geburt auslösen konnten, bestätigten diese Beobachtung (OSINGA, 1969; BROWN et al., 1970; KARG et al., 1971).

ADAMS u. WAGNER (1970), SKINNER et al. (1970) u. SKINNER, JÖCHLE u. NEL (1970) berichten über Erfolge bei der Induktion der Geburt bei Schafen durch einmalige intramuskuläre Verabreichung von Dexamethason (10 - 20 mg) bzw. Flumethason an das Muttertier. Um die physiologischen Vorgänge bei der Geburtsauslösung besser erkennen zu können, sind jedoch Messungen der endogenen Glucocorticoidkonzentration im foetalen und maternellen Kreislauf notwendig. BASSETT u. THORBURN (1969) bestimmten die Glucocorticoidkonzentration der Vena jugularis bei 4 graviden Schafen und simultan in der Arteria carotis bei den Foeten ab dem 110. Tag der Gravidität. Sie fanden, abgesehen von erhöhten Werten der Mutterschafe unmittelbar nach dem operativen Eingriff, durch den die foetalen Glucocorticoidwerte nicht beeinträchtigt wurden, übereinstimmend niedrige Glucocorticoidkonzentrationen unter 2 µg/100 ml Plasma bei Foeten und Muttertieren. Bei den Föten stiegen diese Werte einige Tage vor der Geburt steil an (bis maximal 26 µg/100 ml), ohne daß sich die Glucocorticoidwerte im mütterlichen Blutplasma erhöhten. Dieser Anstieg der foetalen Glucocorticoidwerte wird im Zusammenhang mit der Geburtseinleitung diskutiert. Die Tatsache der einseitigen Erhöhung der Glucocorticoide im foetalen Kreislauf deutet aber auf eine placentäre Schranke hin. In einer eingehenden Studie versuchten BEITINS et al. (1970 a) diese plazentäre Schranke für Cortisol beim

Schaf näher zu definieren. Die genannten Autoren stellten bei drei Schafen am 121. Tag der Gravidität unterschiedliche Cortisolkonzentrationen im Blutkreislauf fest, wobei die Konzentration im mütterlichen Plasma (5, 26 µg/100 ml) im Mittel mehr als doppelt so groß war, wie im foetalen (2,39 µg/100 ml). Weiter wurde errechnet, daß das maternelle Cortisol fast vollständig von den mütterlichen Nebennieren gebildet wurde, während umgekehrt das Plasmacortisol des Foeten auch teilweise aus dem mütterlichen Blutkreislauf zu stammen scheint. Der Anteil des vom Foeten selbst gebildeten Cortisols am gesamten Plasmacortisol im foetalen Kreislauf lag unterschiedlich bei 60 %, 71 % bzw. 99 %. Aufgrund dieser Kalkulation war eine gewisse plazentäre Schranke für Plasmacortisol eindeutig nachgewiesen. Es scheinen jedoch starke individuelle Unterschiede zu bestehen. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei Umkehr des Konzentrationsgefälles eine Diffusion von foetalem zu maternellem Blut nicht stattfinden kann. Die Ergebnisse von BEITINS et al. (1970 a) konnten von DIXON et al. (1971) im wesentlichen bestätigt werden. Bemerkenswert ist auch, daß letztere Autoren beträchtliche Schwankungen in den Cortisolkonzentrationen des foetalen Plasmas feststellen konnten, wobei die Cortisolwerte im foetalen Kreislauf z.T. die bei der Mutter gemessenen Werte überstiegen. In diesem Zusammenhang sind auch die Untersuchungen von LIGGINS (1969) zu sehen, der bei Dauerinfusion von Dexamethason (0,1 mg/24 Std) direkt in den foetalen Kreislauf innerhalb 3,5 bis 5,5 Tagen eine vorzeitige Geburt auslösen konnte, während bei einer achttägigen Infusion in den mütterlichen Kreislauf (4,0 mg/24 Std) keine Geburt ausgelöst wurde.

ADAMS u. WAGNER (1970) ermittelten die Glucocorticoidkonzentration im peripheren Blut bei 10 graviden Kühen. Sie konnten einen Anstieg 4 Tage ante partum und den Abfall der Werte 3 Tage post partum verzeichnen.

Die hohen Plasmacortisolkonzentrationen im letzten Trimester der Gravidität der Frau können wohl nicht in Zusammenhang mit der Geburtsauslösung gesehen werden, da dieser Anstieg im wesentlichen durch eine steigende Transcortinkonzentration hervorgerufen wird (siehe Kap. 1.1.3.1.). Andererseits konnten ROSENTHAL et al. (1969) zeigen, daß bei der Frau eine deutliche Zunahme der freien, biologisch aktiven Cortisolkonzentration im Verlauf der gesamten Gravidität stattfindet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Glucocorticoide zumindest bei den Wiederkäuern Schaf und Rind eine wichtige Funktion bei der Auslösung des Geburtsgeschehens haben.

Die genaue Wirkungsweise der Glucocorticoide bei der Geburtsinduktion dieser Tierarten ist noch nicht eindeutig geklärt. Bei anderen Spezies ist ein so deutlicher Zusammenhang zwischen Geburt und Glucocorticoiden noch nicht erwiesen. Durch Glucocorticoidgaben an trächtige Stuten und gravide Sauen konnte bisher keine vorzeitige Geburt herbeigeführt werden (ADAMS u. WAGNER, 1970; JÖCHLE et al.,1971).

Wie aus der Literatur ersichtlich war, kommt den Glucocorticoiden bei der Spezies Rind nicht nur im intermediären Stoffwechsel, sondern auch direkt im Fortplanzungsgeschehen eine bedeutende Funktion zu. Um diese funktionellen Vorgänge, über die bisher noch sehr wenig bekannt ist, erkennen und messen zu können, ist es notwendig, über empfindliche und spezifische Meßverfahren zu verfügen. In der vorliegenden Arbeit sind Versuche zur Entwicklung solcher Verfahren beschrieben.

2. METHODEN UND METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER GLUCOCORTICOIDE

2.1 Grundsätzliche Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung von Glucocorticoiden

Zur spezifischen Bestimmung einzelner Glucocorticoide ist es notwendig mit exakten chemisch-physikalischen oder biochemischen Methoden zu arbeiten. Diese Verfahren haben in vieler Hinsicht die biologischen Bestimmungsmethoden abgelöst, die ja lediglich die biologischen Wirkungen bestimmter Hormongruppen erfassen und nicht zwischen den zu dieser Hormongruppe gehörenden Verbindungen unterscheiden. Diese Verfahren schieden daher, auch wegen ihrer relativ geringen Empfindlichkeit, für unsere Untersuchungen aus.

Es erscheint nicht sinnvoll, die zahlreichen für die Glucocorticoidbestimmung entwickelten Meßverfahren hier im einzelnen zu beschreiben. Gemeinsam ist diesen Verfahren jedoch, daß zur Erfassung der Glucocorticoide im biologischen Material, dieses zuerst extrahiert werden muß. Je nach Spezifitätsansprüchen haben sich dann ein oder mehrere Reinigungsschritte anzuschließen. Bei der Auswahl der Methode wird man sich davon leiten lassen müssen, welche Geräte zur Verfügung stehen und welche Anforderungen an die Spezifität und Schnelligkeit der Methode gestellt werden sollen. Insbesondere ist darauf zu achten, mit welcher Hormonkonzentration man im biologischen Material zu rechnen hat.

Im folgenden sollen die wichtigsten Meßprinzipien für die Bestimmung der Glucocorticoide Cortisol und Corticosteron im Blut kurz beschrieben werden.

2.1.1 Die colorimetrischen Verfahren

Die colorimetrischen Verfahren haben eine große Verbreitung gefunden. Das geschah wohl auch deshalb, weil ihre Durchführung relativ einfach erscheint. Den meisten Bestimmungsverfahren liegen die folgenden drei Farbreaktionen zugrunde:

2.1.1.1 Die Tetrazoliumblau-Farbreaktion

Die Tetrazoliumblau-Farbreaktion kann zur Bestimmung aller Glucocorticoide herangezogen werden, die eine 20-Keto-21-hydroxyl-gruppe besitzen (CHEN u. TEWELL, 1951). Durch diese "Alpha-ketol-seitenkette" wird der Farbstoff Tetrazoliumblau zu "Blau Formazan" reduziert, das ein Absorbtionsmaximum bei 520m/u hat. Nach Angabe von PERON (1962) liegt die untere Meßgrenze für Corticosteron und Cortisol bei 1,0/ug im Reaktionsansatz. Da ja viele Glucocorticoide diese Seitenkette haben und, wie zahlreiche andere reduzierende Verbindungen ebenso, auf die Reaktion ansprechen, ist es notwendig, zur spezifischen Bestimmung einer Verbindung, z.B. von Cortisol oder Corticosteron, nach der Extraktion noch weitere Reinigungs- und Isolationsschritte durchzuführen.

2.1.1.2 Die Porter-Silber Farbreaktion

Mit Hilfe der Porter-Silber Farbreaktion (PORTER u. SILBER, 1950) können alle Glucocorticoide mit einer 17 α, 21-Dihydroxy-20-keto-seitenkette gemessen werden. Der wichtigste Vertreter dieser Steroidgruppe ist Cortisol. Als Farbreagenz dient in alkoholischer Schwefelsäure gelöstes Phenylhydrazin. Dabei bildet sich mit dem Steroid ein gelbes Biphenylhydrazon (SILBER u. PORTER, 1957) mit einem Absorptionsmaximum bei 410 m/u. Die unterste Nachweisgrenze der Farbreaktion scheint, wie von NELSON u. SAMUELS (1952) angegeben, bei 0,1/ug im Reaktionsansatz zu liegen.

Da auch diese Farbreaktion durch andere Verbindungen unspezifisch beeinflußt werden kann, ist es notwendig, nach der Extraktion noch zusätzliche Reinigungsschritte anzuhängen.

2.1.1.3 Die Zimmermannreaktion

Die nach ZIMMERMANN (1935) benannte Reaktion erlaubt die chemische Bestimmung von 17-Ketosteroiden mit m-Dinitrobenzol. Um diese Reaktion zur Analyse der Glucocorticoide in Anspruch nehmen zu können, ist es allerdings notwendig, die C_{21}-Steroide mit Kalium- oder Natriumwismutat oxydativ in 17-Ketosteroide zu überführen. Dies gelingt aber nur mit 17-OH-Corticosteroiden, also nicht mit Corticosteron.

Bei Durchführung der Farbreaktion muß berücksichtigt werden, daß auch andere, ursprünglich vorhandene 17-Ketosteroide mitgemessen werden. Zu der geringen Spezifität kommt bei der Zimmermannreaktion auch noch eine relativ geringe Empindlichkeit. PERON et al. (1962) geben in ihrer zusammenfassenden Darstellung für die Wismutoxydation eine untere Empfindlichkeitsgrenze von etwa 10 µg an. Diese Methode, die hauptsächlich für die Glucocorticoidbestimmung im Urin angewandt wird, kam daher von Anfang an für die Bestimmung von Cortisol im Rinderblut nicht in Frage.

2.1.2 Die Fluoreszenzmethoden

Die Fluoreszenzmethoden zeichnen sich gegenüber den colorimetrischen Verfahren durch eine höhere Empfindlichkeit aus, die allerdings durch einen höheren Arbeitsaufwand erkauft werden muß. Man unterscheidet zwischen Alkalifluoreszenz, Säurefluoreszenz und Fluoreszenzauslöschung.

2.1.2.1 Die Alkalifluoreszenz

Gewisse Steroide fluoreszieren unter alkalischen Bedingungen (BUSH, 1952), wobei die Fluoreszenz spezifisch für die Δ^4-3-Keto-octahydronaphthalingruppe dieser Steroide ist (BUSH, 1954). ABELSON u. BONDY (1955) benützten diese Eigenschaft zur quantitativen Messung von Glucocorticoiden in Lösung, während erstmals AYRES et al. (1957) damit Glucocorticoide semiquantitativ auf Chromatographiepapier bestimmten. Die untere Nachweisgrenze dieser Methode liegt für die direkte Bestimmung von Cortisol auf Papierchromatogrammen bei 0,05 - 0,1 µg/cm^2 (BUSH, 1961) und, etwas niedriger, bei 0,05 µg für Cortisol in Lösung (ABELSON u. BONDY, 1955).

2.1.2.2 Die Säurefluoreszenz

Die Behandlung von Steroiden mit konzentrierten Säuren liefert im UV-Bereich Fluoreszenzspektren, die für die verschiedenen Steroide spezifisch sind. Dieses Nachweisverfahren hat sich auch für die Glucocorticoide bewährt und wird in vielen Variationen angewandt (De MOOR et al., 1960; BUTTE u. NOBLE, 1968).

Während bei den meisten Bestimmungsmethoden die Glucocorticoide direkt mit Säure behandelt werden, berichteten CLARK u. RUBIN (1969) über ein Verfahren, in dem sie Cortisol nach vorangegangener chemischer Umsetzung säurefluorimetrisch bestimmen. Sie konnten durch die vorgeschaltete Derivatbildung vor allem die Spezifität dieser Methode verbessern. Die untere Nachweisgrenze der Säurefluoreszenzmethoden liegt, wie aus einer Übersicht von DIXON et al. (1967) hervorgeht, bei 0,5 µg Cortisol oder Corticosteron.

2.1.2.3 Die Fluoreszenzauslöschmethode

Sie eignet sich besonders zur direkten Messung der Gluco-

corticoide auf Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzindikator. Das Prinzip beruht darauf, daß die Δ^4-3-Ketogruppierung im A-Ring der Glucocorticoide in der Lage ist, die im UV-Licht (254 m/u) auf der Platte erzeugte Fluoreszenz zu löschen.

UETWILLER u. KELLER (1968) beschreiben ein empfindliches Verfahren zur direkten quantitativen Messung von Cortisol, Corticosteron und Cortison auf Kieselgelplatten. Die Empfindlichkeitsgrenze dieser Methode liegt bei 0,1 /ug - 0,2 /ug/ Steroidfleck.

2.1.3 Die UV-Messung

Steroide mit der Δ^4-3-Ketogruppierung im A-Ring (siehe auch Kapitel 2.1.2) zeigen im UV-Licht bei 240 m/u ein Absorptionsmaximum und können so quantitativ gemessen werden (DUSZA et al. 1963). ESTERGREEN u. VENKATASESHU (1967) bestimmten auf diese Weise Cortisol und Corticosteron im peripheren Rinderplasma, wozu sie allerdings für eine Bestimmung 1 - 2 l Blut benötigten. Die Anwendung dieser Methode erfordert ein hochgereinigtes Meßprodukt, um störende Quencheffekte ausschließen zu können. Die untere Meßgrenze liegt unterschiedlich, je nach Extinktionskoeffizient des vorliegenden Steroides, im unteren /ug-Bereich.

2.1.4 Die gaschromatographischen Verfahren

Die direkte gaschromatographische Bestimmung von Steroiden mit einer 17 α, 21-Dihydroxy-20-ketoseitenkette ist mit Schwierigkeiten verbunden. Diese Steroide sind thermolabil und durch Pyrolyse entstehen 17-Ketosteroide. Bei dem ersten gaschromatographischen Bestimmungsversuch von Vanden HEUVEL u. HORNING (1960) mußte daher streng darauf geachtet werden, daß der zu messende Extrakt frei von kontaminierenden 17-Ketosteroiden

war. Eine Modifikation dieses Verfahrens ist die Methode von BAILEY (1964) und GERDES und TELLER (1968), die die Seitenkette bereits vor der Gaschromatographie durch Oxydation abspalteten und so 17-Ketosteroide herstellten. Erfolgreich waren schließlich die Versuche von GARDINER u. HORNIG (1966) und KELLY (1969a, 1969b), durch Oximbildung und Herstellung von Silylestern das Glucocorticoidmolekül zu stabilisieren. Es ist selbstverständlich, daß durch die zahlreichen Derivatbildungen Steroid verloren geht und die Empfindlichkeit der Methode negativ beeinflußt wird. Die Verfahren sind zudem sehr aufwendig und für den Routinegebrauch wenig geeignet (nur wenige Bestimmungen pro Woche durchführbar) und haben daher allgemein wenig Anklang gefunden.

2.1.5 Die Doppelisotopenderivatverdünnungsmethoden

1966 beschrieben COGHLAN et al. eine Doppelisotopenderivatverdünnungsmethode zur Bestimmung von Cortisol, Corticosteron und Aldosteron in der Vena suprarenalis des Schafes. FRASER u. JAMES berichteten 1968 über ein ähnliches Verfahren zur simultanen Erfassung derselben Corticoide im peripheren menschlichen Plasma. Für eine Analyse genügen den letztgenannten Autoren 25 ml Blutplasma, wobei die untere Nachweisgrenze mit 0,16 µg/100 ml Plasma für Corticosteron und 1,6 µg/100 ml für Cortisol angegeben wird. Das Prinzip dieser äußerst spezifischen Methode beruht darauf, daß nach Zugabe von radioaktiv markiertem Hormon zum Plasma, dieses radioaktive Hormon und das gleiche, im Plasma vorhandene, endogene Hormon mit einem anderen Isotop nochmals markiert werden. Aus dem Verhältnis der beiden Isotope zueinander kann dann die endogene Hormonkonzentration berechnet werden. Die Schwierigkeit dieser Methode liegt darin, den in der Reaktion nicht verbrauchten Anteil des 2. Isotops gänzlich zu entfernen und ein konstantes Impulsverhältnis der beiden markierten Steroi-

de herzustellen. Dies kann nur in sehr aufwendigen Reinigungsschritten geschehen. Diese komplizierte Methode kann nur in wenigen Laboratorien durchgeführt werden. Auch wegen des erforderlichen Zeitaufwandes pro Probe und den hohen Kosten für die radioaktiv markierten Verbindungen eignet sie sich in keiner Weise für Routineuntersuchungen.

2.1.6 Die Proteinbindungsmethoden und der Radioimmunotest

Erstmals 1963 bestimmten MURPHY et al. mit einer kompetitiven Proteinbindungsmethode Cortisol. Diese Methode hatte zunächst wenig Anklang gefunden, da zeitaufwendige Dialyseverfahren notwendig waren, um gebundenes und nicht gebundenes Hormon zu trennen. Zudem stand radioaktiv markiertes Cortisol nur mit einer niedrigen spezifischen Aktivität zur Verfügung, was sich auf die Empfindlichkeit der Methode ungünstig auswirkte. In letzter Zeit gelang es jedoch, die Dialyseverfahren durch Absorptionsverfahren zu ersetzen (MURPHY u. PATTEE, 1964; NUGENT u. MAYES, 1966; MURPHY, 1967a; SLAUNWHITE u. SANDBERG, 1970). Da außerdem Steroide mit hoher spezifischer Aktivität inzwischen erhältlich sind, ist es erstmals möglich, mit einem hochempfindlichen und spezifischen Verfahren Glucocorticoide ohne allzu großen Aufwand zu bestimmen. Auf die Proteinbindungsmethode wird in Kap. 2.3 näher eingegangen.

Neuere Bestrebungen gehen dahin, einen Radioimmunotest für Glucocorticoide zu entwickeln, nachdem es ERLANGER et al. schon 1957 gelungen war, Antikörper gegen Cortison zu gewinnen. Diese Verfahren befinden sich jedoch noch in Entwicklung (MIDGLEY u. NISWENDER, 1970).

2.2 Eigene Versuche zur Bestimmung von Cortisol und Corticosteron im peripheren Rinderblut mit colorimetrischen Methoden

Die Versuche wurden im Jahr 1967 aufgenommen. Corticosteron

und Cortisol sollten zunächst - nach chromatographischer Trennung - mit der Tetrazoliumblau-Farbreaktion quantitativ gemessen werden. Zu Kontrollzwecken sollte Cortisol noch zusätzlich mit der Porter-Silber Reaktion bestimmt werden. Sowohl die Tetrazoliumblau-Farbreaktion (RIEGLE u. NELLOR, 1967), als auch besonders die Porter-Silber Reaktion wurden von zahlreichen Autoren (NELSON u. SAMUELS, 1952; SILBER u. PORTER, 1954 u. 1957; ROBERTSON u. MIXNER, 1956; BRUSH, 1958; SHAW et al., 1960) für die Plasmaglucocorticoidbestimmung eingesetzt und schien deshalb für den Routinetest geeignet zu sein. Die relativ geringe Empfindlichkeit dieser Methoden sollte durch Entnahme größerer Blutmengen ausgeglichen werden.

2.2.1 Gemeinsamer Aufarbeitungsgang

2.2.1.1 Materialien und Reagentien

Alle Materialien und Reagentien waren p.a. Qualität. Sämtliche Lösungsmittel wurden noch zusätzlich vor Gebrauch destilliert. Lediglich Petroläther (Siedebereich 50 - 70°C) wurde der Reihe nach zweifach zunächst mit gesättigter Kaliumpermanganatlösung, dann mit Aqua dest., konzentrierter Schwefelsäure, Aqua dest., gesättigter Natriumbicarbonatlösung und schließlich nochmals mit Aqua dest. ausgeschüttelt, letzteres so oft, bis sich der pH-Wert des Wassers nicht mehr änderte. Dies war meist nach drei Waschungen der Fall. Nach mindestens zwölfstündiger Trocknung über wasserfreiem Kalziumchlorid in einem dunklen Raum wurde der Petroläther fraktioniert destilliert. Die radioaktiven Substanzen Corticosteron-1,2-T (spez. Aktivität 1000 mCi/mM) und Hydrocortison-7-T (spez. Aktivität 417 mCi/mM) wurden vom Radiochemical Centre Amersham be-

zogen und nach dünnschichtchromatographischer Prüfung verwendet. Die nicht radioaktiv markierten Steroide Cortisol[+)] und Corticosteron [+)] wurden mittels Papierchromatographie und Schmelzpunktbestimmung auf Reinheit und Identität überprüft.

2.2.1.2 Gewinnung der Blutproben

Blut wurde durch Punktion der Vena jugularis von Kühen der Rasse "Deutsches Braunvieh" gewonnen. Die Tiere waren an die Blutabnahme gewöhnt und zeigten in der Regel keine Unruheerscheinungen. 50 - 100 g Blut wurden gesammelt, nach Entnahme sofort im Eisbad gekühlt und dort bis zur Extraktion, die innerhalb einer Stunde erfolgte, belassen.

2.2.1.3 Interne Standardisierung und Extraktionsgang

Um die während des Aufarbeitsganges auftretenden Glucocorticoidverluste abschätzen zu können, wurde ein sog. interner Standard eingeführt. Mit Hilfe dieses internen Standards konnten auch die Corticosteron- und Cortisolzonen auf den Papierchromatogrammen exakt lokalisiert werden (siehe unten). Zu diesem Zweck wurden 0,063 µCi Hydrocortison-7-T und 0,036 µCi Corticosteron -1,2-T, in je 100 λ Äthanol gelöst, in einen Erlenmeyerkolben einpipettiert. Dann wurde das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom bei 40°C abgedampft. Der so vorbereitete Erlenmeyerkolben diente zur Aufnahme des Blutes, wobei die Gerinnung, anfangs durch Zusatz einer zehnprozentigen Natriumzitratlösung (5 ml/100 g Blut), später durch ein Heparinpräparat (Liquemin - Roche; 300 λ /100 g Blut) verhindert wurde. Die gewonnene Blutmenge wurde durch Differenzwägung festgestellt. Das Gesamtblut wurde nun nach der Vor-

---

+) Wir danken der Fa. Schering, Berlin und der Synthex-Co., Palo Alto, USA für die Überlassung dieser Substanzen.

schrift von GASSNER et al. (1960) extrahiert, wobei sowohl die an Blutzellen und Plasmaprotein gebundenen, als auch die freien Glucocorticoide des Blutes extrahiert werden. Dem Blut wurden unter ständigem Rühren allmählich, bezogen auf 100 g Blut, 50 ml eines Äther-Äthanol-Gemisches (Verhältnis 3 : 1) sowie 20 bis 30 g wasserfreies Natriumsulfat zugegeben. Es bildete sich ein körniges Präzipitat aus den zelligen Blutbestandteilen und Plasmaproteinen. Das Präzipitat wurde über einen Büchnertrichter abfiltriert und noch dreimal mit dem genannten Lösungsmittelgemisch nachextrahiert. Der gewonnene Extrakt wurde in einen Rundkolben transferiert und im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Die Temperatur des Wasserbades lag bei max. 40°C. Der niedergetrocknete Extrakt wurde nun in ca. 30 ml 90 %igem Methanol aufgenommen und zur Abtrennung von fettigen Bestandteilen in vier 100 ml Scheidetrichtern gegen Petroläther ausgeschüttelt. Schwer trennbare Emulsionen konnten durch vorsichtiges Schütteln vermieden werden. In den vereinigten Methanolfraktionen wurde durch Zugabe von Aqua dest. der Wasseranteil auf 20 bis 30 % gehoben und die so erhaltene Lösung für mindestens 48 Std in den Gefrierschrank (-18°C) gebracht. In der Kälte kam es zum Ausfallen weiterer noch vorhandener fettiger Bestandteile, die abfiltriert wurden (ZANDER u. SIMMER, 1954). Dieser letzte, relativ zeitaufwendige Reinigungsschritt hatte jedoch große methodische Verluste zufolge.

Nach dem Niedertrocknen der wässrigen Methanolfraktion im Rotationsverdampfer erfolgte eine papierchromatographische Reinigung und gleichzeitige Trennung von Cortisol und Corticosteron in dem Lösungsmittelsystem nach BUSH (BUSH, 1961), wobei Isooktan : Toluol (1 : 3) die mobile und 80 %iges Methanol die stationäre Phase waren. Zu diesem Zweck wurde der niedergetrocknete Extrakt in einigen Tropfen Äthanol aufgenommen und auf, mit Methanol vorgereinigte, Papierchromatographiestreifen (4 cm x 56 cm; Schleicher & Schüll Nr. 2316) aufgetragen. Die Äquilibrationszeit betrug 2 Std, die Laufzeit 4 Std. In die-

sem System lagen die R_f-Werte für Cortisol bei 0,074 und für Corticosteron bei 0,542. Die Lokalisation der Steroidzonen erfolgte über den radioaktiven internen Standard (siehe S. 27) mit einem Papierstreifenscanner der Fa. Tracerlab. Die so lokalisierten Zonen wurden ausgeschnitten und über ein Tropfgefäß, das in einer gebogenen Kanüle endete, mit 5 ml Methanol in das zum Auffangen bestimmte Glas eluiert.

2.2.1.4 Bestimmung des Aufarbeitungsverlustes

Nach Durchführung der Papierchromatographie erfolgte die Bestimmung des Aufarbeitungsverlustes. Die Proben wurden dazu auf ein bestimmtes Volumen (b 2) gebracht, von dem eine Teilmenge (b 1) entnommen und die darin vorhandene Radioaktivität (a 1) in einem Flüssigkeitsscintillationszähler der Fa. Tracerlab bestimmt wurde. Das Gerät war auf eine optimale Trennung der beiden Nukleide C^{14} und H^3 eingestellt worden. Die Zählausbeute für Tritium lag bei ca 32 %. Als Scintillationsflüssigkeit wurden 10 ml eines Gemisches benutzt, das sich aus 42 ml Liquifluor (Pilot Chemicals Mass.) und 1 l Toluol p.a. zusammensetzte. Das ergab eine Konzentration von 4 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 50 mg POPOP [1,4-Bis-2(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol] pro 1 l Scintillationsflüssigkeit. Zur Vermeidung von unerwünschten Quencheffekten wurde streng darauf geachtet, daß vor der Zugabe der Scintillationsflüssigkeit sämtliche Lösungsmittel im Zählglas zur Trockne gebracht worden waren. Die vom Zählgerät für eine Probe als Ergebnis gelieferten Impulse/min (cpm) wurden nach Feststellung der Zählausbeute (c) auf den Wert der absoluten Zerfallserscheinungen/min (dpm) umgerechnet. Die prozentualen Aufarbeitungsverluste können durch Vergleich der dpm-Zahl des der Blutprobe anfangs zugesetzten

internen Standards mit der noch vorhandenen Radioaktivität im Aufarbeitungsprodukt ermittelt werden. Dabei gilt folgende Formel für die Berechnung der Wiederfindung:

$$WF = \frac{a_1}{a_2 \cdot c} \left(\frac{b_2}{b_1} - 1 \right) \cdot 10^4$$

WF = Wiederfindung (%) in der noch vorhandenen Restprobe
a_1 = Radioaktivität (cpm) im entnommenen Teilvolumen b_1
a_2 = Radioaktivität (dpm) des anfangs zugegebenen radioaktiven internen Standards
b_1 = Teilvolumen (λ), das zur Zählung aus dem Gesamtvolumen (b_2) entnommen wurde
b_2 = Gesamtvolumen (λ)
c = Zählausbeute des Gerätes (%) zur Zeit der Zählung

2.2.2 Versuche mit der Tetrazoliumblau-Farbreaktion

2.2.2.1 Durchführung der Farbreaktion

Es kam die Methode von ELLIOTT et al. (1954), wie von PERON (1962) angegeben, zur Anwendung.

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Merck) wurde durch Umkristallisationen aus einem Äthanol-Aceton-Gemisch nachgereinigt. Reagens A bestand aus einer gesättigten Lösung von Tetrazoliumblau in absolutem Äthanol (ca. 150 mg %). Diese Lösung kann unbegrenzt lange bei 4°C gelagert werden. Reagens B mußte dagegen jeden Tag frisch angesetzt werden. Hierzu wurden 0,30 ml einer 10 %igen Lösung von Tetramethylammoniumhydroxyd (Merck) in einem Meßkölbchen mit Äthanol auf 10 ml aufgefüllt. Die Standardverdünnungen von Cortisol und Corticosteron wurden in Äthanol angesetzt.

Die Farbreaktion selbst wurde in etwa 12 cm hohen Reagensgläsern durchgeführt. Die darin niedergetrockneten biologischen Proben bzw. Standardsubstanzen wurden in 0,2 ml

Äthanol und 5 Tropfen Dichlormethan aufgenommen und, um die Steroide in Lösung zu bringen, 5 sec lang in ein kochendes Wasserbad gestellt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden nochmals 5 Tropfen Dichlormethan zugeführt, sowie 0,15 ml Reagens A und 0,15 ml Reagens B. Die Proben wurden kräftig geschüttelt und dann 20 min lang im Wasserbad bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 ml Äthanol wurden die Proben innerhalb von 30 min an einem Beckman DB-Spektralphotometer bei 520 mμ in 1 cm Glasküvetten gegen Äthanol gemessen. Die mit Standardsubstanzen erhaltene Eichkurve war über den getesteten Bereich von 0 - 10 μg linear. Die Extinktionskoeffizienten für Cortisol und Corticosteron waren identisch.

2.2.2.2 Überprüfung der Methode

2.2.2.2.1 Ergebnisse der Tetrazoliumblau-Farbreaktion nach Anwendung des vorgesehenen Aufarbeitungsganges

Unter Anwendung des im Kap. 2.2.1 beschriebenen Aufarbeitungsganges wurden Blutproben, die an 11 verschiedenen Tagen innerhalb eines Zeitraumes von 2 Wochen vor und 2 Wochen nach der Geburt einer Kuh ("Rk") abgenommen worden waren auf Cortisol und Corticosteron analysiert. Wir fanden unabhängig vom Tag der Blutentnahme Cortisolwerte von 21,6 bis 153,3 μg und Corticosteronwerte zwischen 26,5 und 181,5 μg/100 g Gesamtblut.

Diese Glucocorticoidwerte lagen über den Meßergebnissen anderer Autoren, die Cortisol und Corticosteron im Plasma des peripheren Rinderblutes mit der Tetrazoliumblau-Farbreaktion und der Porter-Silber Reaktion untersucht hatten (ROBERTSON u. MIXNER, 1956; BRUSH, 1958; PATERSON , 1957; SHAW et al., 1960; RIEGLE u. NELLOR, 1967).

Insbesondere sprachen die relativ niedrigen Glucocorticoidwerte im Rinderplasma (1,5 - 5,1 μg Corticosteron und 3,2 - 13,1 μg Cortisol in 100 ml Plasma), die von ESTERGREEN und VENKATASESHU (1967) inzwischen mit einer UV-Methode gefunden worden waren, gegen die Richtigkeit der eigenen Tetrazoliumblau-

Messungen. Diese Autoren konnten die Zuverlässigkeit ihrer UV-Methode u.a. dadurch unterstreichen, daß sie in einer Sammellösung von Corticosteron- bzw. Cortisolfraktionen nach weiteren Reinigungsschritten beide Steroide mittels Infrarotspektrographie positiv identifizieren konnten.

2.2.2.2.2 Ergebnisse der Tetrazoliumblau-Farbreaktion nach Anfügung weiterer Reinigungsschritte

Um die Zuverlässigkeit der eigenen Untersuchungsmethoden zu überprüfen, wurde der bisherige Aufarbeitungsgang durch weitere chromatographische Schritte ergänzt.

Zur Beseitigung der nach der Lösungsmitteltrennung und Kälteausfällung noch in starkem Maße vorhandenen Verunreinigungen, die sich in einer intensiven Gelbfärbung der Proben zeigten, wurde zusätzlich eine säulenchromatographische Reinigung der Proben durchgeführt. Dazu wurde eine 25 cm lange Säule mit Glasfritte und einem inneren Durchmesser von 5 mm bis zu einer Höhe von 16 cm mit Kieselgel (Kieselgel für die Säulenchromatographie- Merck, Korngröße 0,05 - 0,2 mm), das in Benzol aufgeschwemmt war, gefüllt. Die Vorreinigung des Kieselgels geschah mit Benzol, Methanol und nochmals Benzol. Danach wurde die in Benzol gelöste Probe aufgetragen. Zum Eluieren der beiden Glucocorticoide wurden folgende Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische nacheinander eingesetzt:

40 ml Benzol
25 ml Benzol : Äthanol = 9 : 1
60 ml " : " = 7 : 1
35 ml " : " = 5 : 1
35 ml " : " = 3 : 1

5 ml Fraktionen wurden gesammelt und die Fraktionen 13 bis 35, die Cortisol und Corticosteron enthielten, vereinigt.

In einigen Fällen wurden die nach der ersten Papierchromatographie bereits weitgehend gereinigten Proben nochmals papier- und dünnschichtchromatographisch bearbeitet. Als Adsorbens für die Dünnschichtchromatographie wurde dreimal mit Methanol gewaschenes Kieselgel mit UV-Indikator (MN-Kieselgel G-HR/UV_{254}; Macherey, Nagel & Co.) benützt. Die Platten wurden in dem System Aceton : Äthanol = (4 : 1) entwickelt und die Zonen durch mitlaufende, links und rechts von der Probe aufgetragene Standardsubstanzen im UV-Licht lokalisiert.

Diese zusätzlichen Reinigungsschritte wurden zur Überprüfung der Tetrazoliumblau-Farbreaktion in den Aufarbeitungsgang eine Blutprobe (Ka 1; 97 g Blut) der Kuh "Ka" eingeschaltet. Nach der Lösungsmitteltrennung und Kälteausfällung wurde zunächst die oben beschriebene Säulenchromatographie eingefügt. Dann erst schloß sich die erste papierchromatographische Reinigung und Auftrennung von Cortisol und Corticosteron an. In den Eluaten wurde die Wiederfindung berechnet und mit einer Teilmenge die Tetrazoliumblau-Farbreaktion durchgeführt. Die Restprobe wurde unter Ausdehnung der Laufzeit für Cortisol auf über 10 Std rechromatographiert und nach Bestimmung des Aufarbeitungsverlustes wiederum der Tetrazoliumblau-Farbreaktion unterworfen. Das Ergebnis ist aus Tab. 1 zu ersehen.

Tab. 1. Ergebnisse der Tetrazoliumblau-Farbreaktion nach Einfügung einer Säulen- und einer zweiten Papierchromatographie in den Aufarbeitungsgang am Beispiel der Probe "Ka 1".

gemessenes Steroid	Tetrazoliumblau positive Chromogene/100 g Gesamtblut gemessen nach der 1. Papierchromatographie	2. Papierchromatographie
Corticosteron	24,7 µg	11,4 µg
Cortisol	136,4 µg	41,0 µg

Bei einer weiteren Blutprobe (Ka 2; 60 g Gesamtblut), in der lediglich Cortisol bestimmt wurde, wurde nach Durchführung der 2. Papierchromatographie eine weitere dünnschichtchromatographische Reinigung, wie auf S. 32 beschrieben, angehängt. Das Ergebnis ist in Tab. 2. dargestellt.

Tab. 2. Ergebnisse der Tetrazoliumblau-Farbreaktion nach Einfügung einer Säulen-, einer zweiten Papier- und einer Dünnschichtchromatographie in den Aufarbeitungsgang am Beispiel der Probe "Ka 2".

	Tetrazoliumblau positive Chromogene/100 g Gesamtblut gemessen nach der		
	1. Papierchromatographie	2. Papierchromatographie	Dünnschichtchromatographie
Tetrazoliumblau positive Chromogene/100 g Blut	17,94	11,48	10,62

Obwohl durch die Einführung der Säulenchromatographie Verunreinigungen sichtbar entfernt werden konnten, zeigt das Ergebnis der beiden Versuche deutlich, daß die gemessenen Werte nach der ersten Papierchromatographie immer noch zu hoch waren. Auch durch die zusätzlich angewandten papier- und dünnschichtchromatographischen Reinigungsschritte wurden noch weitere unspezifische Chromogene abgetrennt.

2.2.3 Versuche mit der Porter-Silber Farbreaktion

2.2.3.1 Durchführung der Farbreaktion

Die Porter-Silber Farbreaktion wurde nach dem von PETERSON et al. (1957) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die bereits stark vorgereinigten Extrakte, wie auch die Standardwerte, wurden also nochmals nach dem von diesen Autoren für die Cortisolbestimmung im Plasma angegebenen Verfahren nachgereinigt.

Phenylhydrazin-HCl (p.a., Merck) wurde vor Verwendung durch Umkristallisationen nachgereinigt. Reagens A war ein Gemisch aus 64 %iger Schwefelsäure und Äthanol im Verhältnis 2 :1. Während Reagens A bei Aufbewahrung im Kühlschrank (4°C) unbegrenzt lang haltbar war, mußte Reagens B - 50 mg Phenylhydrazin-HCl ($C_6H_8N_2 \cdot HCl$) wurden hierzu in 50 ml Reagens A gelöst - in 14 tägigem Turnus frisch bereitet werden. Eine Cortisolverdünnungsreihe wurde in Äthanol hergestellt.

Für die Durchführung der Reaktion wurden die Standardverdünnungen sowie die biologischen Proben in 23 cm hohe Reagenzgläser mit Schliff und 15 mm innerem Durchmesser transferiert und im Stickstoffstrom bei 40°C niedergetrocknet. Danach wurden die Proben in 15 ml Dichlormethan aufgenommen und 20 sec lang gegen 1,2 ml 0,1 n-Natronlauge ausgeschüttelt. Zur Vermeidung von Emulsionen mußte das Durchmischen vorsichtig geschehen. Die Natronlauge wurde dann vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgehebert, Aus der verbliebenen Dichlormethanfraktion wurden jeweils 6,0 ml in zwei 10 ml Reagenzgläser mit Schliff verbracht. Auf diese Weise erhielt man von jeder einzelnen Probe zwei gleiche Teilmengen. Die eine Teilmenge diente als individueller Blindwert für jede Probe. Ihr wurde 0,5 ml Reagens A zugegeben. Die 2. Probe wurde mit 0,5 ml Reagens B behandelt. Anschließend wurden die Proben kräftig geschüttelt. Nach 30 min wurde das überstehende Dichlormethan mit einer Pasteurpipette vollständig abgehebert und verworfen. Der Rest (0,5 ml Reagens) blieb dann 8 - 24 Std bei Zimmertemperatur stehen. Die Messung der Extinktionen erfolgte in Halbmikroküvetten aus Quarz bei 410mμ. Über den getesteten Bereich von 0 - 10 μg war die Standardkurve linear. Alle Messungen wurden nach der von ALLEN (1950) angegebenen Korrektur ausgewertet.

2.2.3.2 Überprüfung der Methode

2.2.3.2.1 Ergebnisse der Porter-Silber Reaktion nach Anwendung des vorgesehenen Aufarbeitungsganges

Im Anschluß an den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Aufarbeitungsgang wurde nach der Papierchromatographie mit einer Reihe von biologischen Proben die Porter-Silber Farbreaktion durchgeführt. Dabei zeigte sich im Gegensatz zur deutlichen Gelbfärbung der Cortisolstandardproben bei den biologischen Proben eher eine Braunfärbung. Die Proben ergaben im Spektralphotometer keine auswertbaren Ergebnisse. Es mußte daran gedacht werden, daß diese Braunfärbung durch immer noch vorhandene Verunreinigungen hervorgerufen wurde, wodurch es scheinbar zu einer "Auslöschung" der Porter-Silber positiven Chromogene bei der Messung kam. Es wurde daher versucht, durch weitere Reinigungsschritte diese Verunreinigungen vor der eigentlichen Farbreaktion zu entfernen.

2.2.3.2.2 Ergebnisse der Porter-Silber Reaktion nach Anfügung weiterer Reinigungsstufen

Eine Blutprobe (Ka 3; 159 g Blut) der Kuh "Ka" wurde, wie im Kapitel 2.2.1 beschrieben, extrahiert. Nach der Kälteausfällung wurde der in Kap. 2.2.2.2.2 beschriebene säulenchromatographische Reinigungsschritt eingefügt. Im Anschluß an die Papierchromatographie wurde die Cortisolfraktion im gleichen System 10 Std lang rechromatographiert. Das Eluat wurde dann halbiert und die Aufarbeitungsverluste an Hand des internen Standards bestimmt. In jeder der beiden Hälften waren nach der vorausgegangenen Reinigungsprozedur noch 30,3 % der ursprünglichen Menge an Cortisol-7-T vorhanden, was einer Ausgangsmenge von 48 g Blut entsprach. In der einen Hälfte des Eluates wurden die Porter-Silber Chromogene bestimmt, mit der anderen wurde zur Kontrolle die Tetrazoliumblau-Reaktion

durchgeführt. Das Ergebnis der Porter-Silber Reaktion war negativ, d.h. in den repräsentierten 48 g Blut wurden keine Porter-Silber positiven Chromogene gefunden. Die Absorptionskurve dieser Proben war identisch mit der des Leerwertes. Dagegen ergab die Tetrazoliumblau Farbreaktion 8,2 µg Chromogen für 48 g effektive Blutmenge.

Es sollte nun festgestellt werden, inwieweit die Porter-Silber Reaktion nach Durchführung des so verbesserten Aufarbeitungsganges durch noch vorhandene Verunreinigungen beeinträchtigt würde.

46,5 g Gesamtblut (Ka 4) wurden in der eben beschriebenen Weise behandelt und der Porter-Silber Reaktion unterzogen. Nach Korrektur des Aufarbeitungsverlustes waren im Extrakt noch 29,5 g Blut repräsentiert. Unmittelbar vor der Farbreaktion wurden 4,0 µg Cortisol dem biologischen Material zugegeben. Die Porter-Silber Reaktion erbrachte genau 4,0 µg Chromogen für diese Probe. Der Anteil an endogenem Cortisol war nach dieser Messung gleich 0 µg. Die Porter-Silber Reaktion wurde also durch biologische Rückstände nicht mehr beeinflußt.

2.2.3.2.3 Ergebnisse der Porter-Silber Reaktion mit biologischem Material, das nicht papierchromatographisch gereinigt wurde

Mit folgender Versuchsreihe sollte in Erfahrung gebracht werden, ob mit dem angewandten Meßverfahren überhaupt Porter-Silber positive Chromogene in peripherem Rinderblut erfaßt werden können. Für diese Versuchsanstellung wurde nach der Extraktion und Kälteausfällung eine erste Teilmenge für die Porter-Silber Reaktion entnommen und nach der säulenchromatographischen Reinigung der Restprobe eine zweite Teilmenge. Zwei Proben der Kuh "Ka" wurden so behandelt, wobei

einmal 40 g (Ka5) und einmal 46 g Blut (Ka6) extrahiert wurden. Die Meßergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3. Vergleich der Porter-Silber Chromogene vor und nach einer säulenchromatographischen Reinigung

		repräsentierte Blutmenge im Reaktionsansatz	Chromogenmenge in ug/100 g Gesamtblut
Probe Ka5	vor der Säule	3,6 g	189 ug
	nach der Säule	11,7 g	0 ug
Probe Ka6	vor der Säule	4,1 g	107 ug
	nach der Säule	12,8 g	0 ug

Wie aus Tab. 3 ersichtlich, wurden in dem relativ ungereinigten Extrakt Porter-Silber positive Chromogene festgestellt. Dagegen konnten nach Durchführung der Säulenchromatographie diese Chromogene nicht mehr gemessen werden, obwohl in dem gemessenen Extrakt ein größerer Blutanteil repräsentiert war.

Die Reste der Proben Ka5 und Ka6 wurden schließlich noch papierchromatographisch gereinigt und nach Ermittlung der Aufarbeitungsverluste vereinigt. Als effektive Blutmenge waren in der Probe Ka5 13,16 g und in der Probe Ka 6 14,85 g Blut repräsentiert. Auch in diesem Pool, der somit 28,01 g Blut vertrat, war die Porter-Silber Reaktion negativ. Eine Braunfärbung der Probe wurde nicht beobachtet.

2.2.4 Beurteilung der colorimetrischen Messungen

2.2.4.1 Die Beurteilung der Tetrazoliumblau-Farbreaktion

Es ist bekannt, daß Tetrazoliumblau nicht nur durch die 20-Keto-21-hydroxylgruppierung der Glucocorticoide reduziert wird, sondern auch von zahlreichen anderen Verbin-

dungen (PERON, 1962). Durch Modifikation der eigentlichen Farbreaktion konnte die Spezifität geringgradig erhöht werden. So konnten MEYER u. LINDBERG (1955) durch Veränderung der Alkalität, der Inkubationszeit und -temperatur eine Methode entwickeln, bei der hauptsächlich die Alphaketol-seitenkette ansprach. TOUCHSTONE u. HSU (1955) versuchten nach Durchführung der Tetrazoliumblau-Farbreaktion auf Papier das Formazan durch ein Essigsäureäthylester-Methanol-Gemisch zu eluieren und im Photometer zu messen. Sie wollten damit erreichen, daß wasserlösliche, die Messung störende Chromogene entfernt werden. Um jedoch mit der Tetrazoliumblau-Farbreaktion spezifisch messen zu können, ist es unbedingt notwendig, das zu messende Steroid vorher zu isolieren. Bei diesen Reinigungsschritten muß darauf geachtet werden, daß, wie von DIXON et al. (1967) und PERON (1962) beschrieben, nicht durch verunreinigte Materialien und Lösungsmittel zusätzlich reduzierende Stoffe in die Reaktion eingehen.

Aus den vorliegenden Versuchen, bei denen deshalb auf größte Reinheit der Materialien und Lösungsmittel geachtet worden war, geht eindeutig hervor, daß mit jedem Reinigungsschritt Tetrazoliumblau positive Chromogene entfernt wurden, da die "Glucocorticoidkonzentration", bezogen auf 100 ml Gesamtblut (Korrektur über den internen Standard) nach jedem Reinigungsschritt zurückging. Da auch noch nach drei chromatographischen Schritten diese Konzentrationsabnahme feststellbar war, schien es nicht sinnvoll, diesen Weg weiter zu verfolgen. Es muß dabei ja auch berücksichtigt werden, daß bei jedem Reinigungsschritt endogenes Glucocorticoid verloren geht und daß schließlich, nach zu vielen Reinigungsschritten, die untere Meßgrenze der Farbreaktion, die bei 0,5 µg liegt, unterschritten wird. Gegen weitere Versuche mit der Tetrazoliumblau-Farbreaktion sprach auch der Befund, daß die hohen Werte nie durch UV-Messungen - soweit durchgeführt - bestätigt werden konnten. Die untere Grenze der UV-Messungen lag bei Verwendung von Halbmikroküvetten bei 0,5 µg

im Meßansatz. Auch die Ergebnisse der Porter-Silber Reaktion (siehe Kap. 2.2.3.2.2) sprachen gegen diese Methode. Weitere Versuche mit der Tetrazoliumblau-Farbreaktion wurden daher nicht durchgeführt.

2.2.4.2 Die Beurteilung der Porter-Silber Farbreaktion

Die Verhältnisse bei Anwendung der Porter-Silber Reaktion liegen ähnlich wie bei der Tetrazoliumblau-Farbreaktion. Hier konnte bereits nach zwei chromatographischen Reinigungsschritten eine Konzentrationsabnahme auf 0/ug festgestellt werden. Im Vergleich zur Tetrazoliumblau-Farbreaktion scheint die Porter-Silber Reaktion jedoch etwas spezifischer zu sein. So konnte in dem Versuch mit der Blutprobe Ka3 (Ka. 2.2.3.2.2) gezeigt werden, daß mit der Tetrazoliumblau-Farbreaktion noch Cortisolwerte gemessen wurden, wo die Porter-Silber Reaktion bereits negativ verlief, obwohl die untere Meßgrenze beider Reaktionen bei 0,5/ug Cortisol verlief. Die Messung lag in diesem Fall eindeutig außerhalb des Meßbereiches. Eine "Löschung" der Porter-Silber positiven Chromogene schied aus, da ein Zusatz von 4/ug Cortisol (Ka4) unmittelbar vor der Farbreaktion präzise wiedergefunden wurde.

Von verschiedenen Autoren wurde die Porter-Silber Reaktion mit anderen Untersuchungsmethoden verglichen. So erhielten CLARK et al. (1970) signifikant höhere Cortisolwerte mit der Porter-Silber Reaktion im Vergleich zu einer fluorimetrischen Methode. Auch BEITINS et al. (1970 b) wiesen inzwischen in vergleichenden Versuchen nach, daß im Vergleich zu Proteinbindungsmethoden und einer Doppelisotopenderivat-Verdünnungsmethode die Ergebnisse der Porter-Silber-Reaktion erheblich höher lagen.

Aufgrund der eigenen Befunde und den inzwischen in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen schien es nicht sinnvoll, weitere Versuche mit der Porter-Silber Reaktion

durchzuführen. Diese Methode war im vorliegenden Fall nicht genügend empfindlich, da nach 2 - 3 chromatographischen Reinigungsschritten die untere Meßgrenze erreicht war.

Während dieser Versuche zeigte es sich auch, daß bei Extraktion von Gesamtblut zunächst sehr viel höhere Glucocorticoidwerte gemessen wurden, als vergleichsweise bei Extraktion von Plasma. Erst nach weiteren chromatographischen Reinigungsschritten wurden mit den eigenen Methoden ähnlich niedrige Konzentrationsbereiche erreicht.

Demnach scheint die Extraktion von Gesamtblut keine signifikant höhere Steroidausbeute als eine Plasmaextraktion zu erbringen, obwohl Verteilungsstudien von MIGEON et al. (1959), VERMEULEN (1961) u. KORNEL et al. (1970) mit radioaktivem Cortisol zeigten, daß 16 bis 37 % der gesamten Radioaktivität an den roten Blutzellen assoziiert war. Die eigene Beobachtung wird durch WHIPP et al. (1967) bestätigt, die bei der Bestimmung von Cortisol und Corticosteron im Plasma und Gesamtblut keine deutlichen qualitativen Unterschiede feststellen konnten.

2.3 Eigene Versuche zur Bestimmung von Cortisol und Corticosteron im peripheren Rinderblut mit einer Proteinbindungsmethode

2.3.1 Theoretische Grundlagen der Proteinbindungsreaktion

Es ist bekannt, daß im Organismus Eiweißkörper mit spezifischer Bindungsaffinität zu bestimmten Steroidhormonen vorkommen. Diese Proteine befinden sich einerseits im Blut, wie bereits in Kap. 1.1.3 geschildert, andererseits kommen sie als spezifische Rezeptorproteine in den Zellen der Erfolgsorgane vor. Im folgenden soll über die spezifisch

steroidbindenden Plasmaproteine und über die Entwicklung einer Proteinbindungsreaktion mit Plasmaproteinen berichtet werden.

2.3.1.1 Die spezifisch Steroid bindenden Plasmafraktionen Transcortin und "Sex Steroid bindendes Plasmaprotein"

Die Bindung von Steroiden an Plasmaproteine ist schon seit langem bekannt. BISCHOFF u. PILHORN (1948), EIK-NES et al. (1954) u. WESTPHAL et al. (1955) beschrieben erstmals die Bindung von Steroiden an Albumin. Erst später wurden die Untersuchungen auf weitere Plasmaproteinfraktionen ausgedehnt. 1957 bzw. 1958 (a) fand DAUGHADAY mit einem Dialyseverfahren im Plasma des Menschen ein α-Globulin mit starker Affinität zu den Glucocorticoiden, das er daher "Corticosteroid bindendes Globulin" (CBG) nannte. Diese Befunde wurden durch weitere elektrophoretische Studien, sowohl von DAUGHADAY (1958 b) selbst, als auch von SLAUNWHITE u. SANDBERG (1959) sowie DOE et al. (1960) bestätigt. SLAUNWHITE u. SANDBERG (1959) bezeichneten das Corticosteroid bindende Globulin des Plasmas erstmals mit "Transcortin". Gleichzeitig bewiesen sie, daß die Dissoziationskonstante temperaturabhängig ist, da die Dissoziation der Corticosteroide vom Transcortin bei 37°C größer ist, als bei 4°C. Im Gegensatz dazu weist die Bindung von Cortisol an Albumin in diesem Temperaturbereich kaum Unterschiede auf (DAUGHADAY, 1960). Weitere Eigenschaften des Transcortins beschrieben De MOOR et al. (1963). Sie fanden, daß die Affinität zwischen Corticosteroid und CBG durch die Ionenkonzentration beeinflußt wird und bei einem pH-Wert um 8 optimal ist.

SEAL u. DOE (1966) dehnten die Untersuchungen auf 130 Wirbeltierspezies aus und fanden in allen untersuchten Blutseren makromolekuläre Fraktionen mit hoher Affinität zu Corticosteroiden. Die Bindungskapazität der einzelnen Blut-

seren für Cortisol war unterschiedlich und meistens mit einer solchen für Corticosteron gekoppelt. Als ersten gelang es SEAL u. DOE (1961 u. 1962) eine hochgereinigte Fraktion menschlichen Transcortins zu isolieren. Weitere chemische und physikalische Eigenschaften des Transcortins sind von WESTPHAL (1970) zusammenfassend dargestellt worden.

Außer dem Transcortin konnte bisher nur noch ein Plasmaprotein mit hoher Bindungsaffinität zu den Steroiden gefunden werden. So schlossen SLAUNWHITE u. SANDBERG (1959) erstmals aus Dialyseversuchen von verdünntem Blutplasma gegen einen Testosteron-Albuminkomplex auf das Vorhandensein einer spezifisch Testosteron bindenden Plasmafraktion. Der direkte Beweis für ein solches Protein wurde von MERCIER et al. (1966) geliefert, die dieses Protein von Transcortin und Albumin trennen konnten. Im gleichen Jahr beschrieben ROSENBAUM et al. (1966) eine Östradiol bindende Plasmaproteinfraktion, die bei der Papierelektrophorese mit dem ß-Globulin des Plasmas wanderte. MURPHY (1967 b), STEENO et al. (1968) u. Van BAELEN et al. (1968) berichteten weiterhin über eine kompetitive Bindung von Östradiol und Testosteron im Plasma. De MOOR et al. (1968) folgerten daraus, daß diese beiden Steroide an dasselbe oder ein ähnliches Plasmaprotein gebunden würden. Dieses Protein wird heute "Sex Steroid bindendes Plasmaprotein" (SBP) genannt. Eine ausführliche Charakterisierung des SBP geben MERCIER-BODARD et al. (1970).

Im Gegensatz zum Albumin, das gegenüber den Steroiden nur eine geringe Affinität, dafür aber eine hohe Kapazität aufweist, gelten die Globuline Transcortin und SBP als spezifische Bindungskörper mit hoher Affinität, aber geringer Kapazität (MILLS,1962). Es handelt sich dabei um nicht kovalente, reversible Bindungen (BAULIEU et al., 1970). Für die biologische Bedeutung des Transcortins ist dies von entscheidender Wichtigkeit.

Wie aus der Bezeichnung "Corticosteroid bindendes Globulin" für Transcortin schon hervorgeht, besitzt dieses Protein eine relativ spezifische Affinität zu den Glucocorticosteroiden. Neben den biologisch aktiven Glucocorticoiden werden aber auch deren Stoffwechselmetaboliten (LEBEAU u. BAULIEU, 1970) und einige Gestagene wie Progesteron und 17-Hydroxyprogesteron mit unterschiedlicher Stärke gebunden (MURPHY, 1967 a). Die Bindung von Sexogenen und Aldosteron ist unbedeutender.

Die Affinität des SBP zu Steroiden beschränkt sich auf die meisten 17ß-Hydroxysteroide (HEYNS et al., 1969).

2.3.1.2 Die Entwicklung der Proteinbindungsreaktion

Die Glucocorticoid bindenden Eigenschaften des Transcortins zogen erstmals MURPHY et al. (1963) zur Entwicklung eines Bestimmungsverfahrens für Glucocorticoide heran. Eine wesentliche Voraussetzung für den Aufbau dieser Methode ist die Tatsache, daß die Steroide mit dem Protein eine reversible Bindung eingehen. Das Verfahren beruht auf folgendem Reaktionsschema:

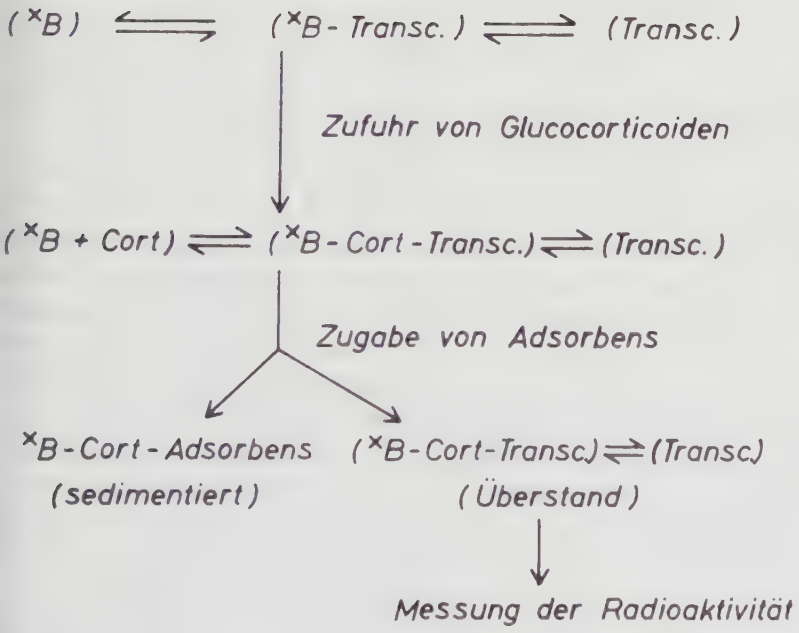
In einem "in vitro"-System stellt sich ein dynamisches Äquilibrium zwischen "Steroid" und dem Steroid bindenden Protein ein, wobei, je nach Art und Menge des Steroids und des Proteins, ein mehr oder minder großer Steroidanteil koordinativ und reversibel an das Plasmaprotein gebunden wird, während der Rest des Steroids frei gelöst ist. Durch weitere Steroidzugabe kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts, in dessen Verlauf ein Teil des ursprünglich gebundenen Steroids aus seiner Bindung verdrängt wird. Diese Verdrängung erfolgt nicht nur durch dasselbe Steroidmolekül (z.B. Cortisol verdrängt Cortisol), sondern auch, abhängig von der Bindungsspezifität, durch ein anderes Steroid (z.B. Progesteron verdrängt Cortisol). Da die Verdrängung in einem bestimmten Konzentrationsbereich proportional mit der Menge des zugege-

benen Steroids verläuft, kann über das freigewordene verdrängte Steroid die Menge des zugegebenen Steroids indirekt gemessen werden. Dieses Verfahren zur Bestimmung von Steroiden wurde von MURPHY "competitive protein - binding analysis" (Kompetitive Proteinbindungsreaktion) genannt. Der Ablauf der Proteinbindungsreaktion ist in Abb. 4 nochmals schematisch dargestellt.

Die quantitative Erfassung der oben beschriebenen Verdrängungsreaktion erfordert nach MURPHY (1964), daß das anfangs an Protein (CBG) gebundene und in der Reaktion zu verdrängende Steroid (Tracer-Steroid) in radioaktiver Form vorliegt. Die Empfindlichkeit der Reaktion wird stark durch die spezifische Aktivität des Tracer-Steroids beeinflußt, da es nur bei hoher spezifischer Aktivität (hohe Impulszahl und geringe Steroidmenge) möglich ist, die Transcortinlösung so zu verdünnen, daß auch durch geringe, dem System zugeführte Steroidmengen eine meßbare Verdrängung stattfindet.

Weiterhin müssen Verfahren existieren, mit denen das freie Steroid vom Protein-Steroidkomplex getrennt werden kann, ohne ihn zu zerstören. Diese Trennung nahmen MURPHY et al. (1963) zuerst durch Gleichgewichtsdialyse vor. Obwohl durch dieses Verfahren das dynamische Äquilibrium kaum beeinflußt wurde, wurden trotzdem bald andere Methoden eingeführt, da mit der Gleichgewichtsdialyse, die bis zu 40 Std dauerte, ein zu großer Aufwand an Zeit verbunden war. Mit Hilfe der Gelfiltration (MURPHY u. PATTEE, 1964; BASSET u. HINKS, 1969) wurde unter geringer Störung des Äquilibriums eine schnellere Möglichkeit zur Trennung der freien von den gebundenen Steroiden erschlossen. Die größte Zeit- und Arbeitsersparnis brachte jedoch erst die Verwendung von Adsorbentien wie dextranbeschichtete Holzkohle (NUGENT u. MAYES, 1966), Florisil, Fuller's earth und Loyd's reagent (MURPHY, 1967 a) oder Ionenaustauschern (SLAUNWHITE u. SANDBERG, 1970), durch welche die freien Steroide selektiv gebunden werden. Wenn auch durch diese Adsorbentien

Abb. 4. Glucocorticoidbestimmung mit der kompetitiven Proteinbindungsreaktion.



×B = radioaktiv markiertes Corticosteron
Cort. = Glucocorticoid
Transc. = Transcortin

das dynamische Gleichgewicht etwas gestört wird, so kann dieser Nachteil gering gehalten werden, wenn die Reaktion bei niedrigen Temperaturen (0° - 4°C) und konstanten Bedingungen ausgeführt wird.

Entscheidend für die Durchführung der Proteinbindungsreaktion ist die Verwendung eines entsprechenden Bindungsproteins. Gewünscht wird eine hohe Spezifität - im optimalen Falle spezifische Bindung eines einzigen Steroids - und eine hohe Bindungsaktivität, wobei diese von der Bindungsaffinität und der Konzentration der Bindungssitze abhängt.

MURPHY (1967 a) konnte in einer Studie zeigen, daß die Bindungsaffinität von Cortisol zu Corticosteron eines 0,5 %igen Rhesusaffenplasmas bei 1 : 5 liegt, während 1,25 %iges Kaninchenplasma Cortisol und Corticosteron im Verhältnis 5 : 2 bindet. Diese tierartlichen Unterschiede geben dem Untersucher eines bestimmten Steroids, z.B. des Corticosterons, die Möglichkeit, das Plasmaprotein der Tierart auszuwählen, dessen Transcortin Corticosteron bevorzugt bindet. Auch die bereits in Kap. 1.1.3.1 beschriebenen alters- und geschlechtsabhängigen Bindungscharakteristika der Transcortinfraktion im Blutplasma können bei der Auswahl eines möglichst spezifischen Bindungsproteins berücksichtigt werden. Die Spezifität der Bindung eines Blutplasmas hängt aber nicht nur von der spezifischen Affinität des darin enthaltenen Transcortins, sondern auch von allen anderen Proteinen ab. Der Einsatz von weitgehend isolierten Transcortinfraktionen für die Proteinbindungsreaktion scheidet wegen der mit der Reindarstellung bislang verbundenen hohen Anforderungen an Zeit, Arbeit und Kosten von vorneherein für den Routinetest aus. Es ist daher heute allgemein üblich, Plasmaverdünnungen zu verwenden, in denen die störenden Einflüsse, vor allem des Serumalbumins, durch den Verdünnungsvorgang stark reduziert werden (VERMEULEN u. VERDONCK, 1970).

Dennoch ist es nicht möglich, auch unter Beachtung aller bekannten Eigenschaften des CBG und optimaler Ausnützung der physiologischen und speziesbedingten Unterschiede der einzelnen Transcortine, ein Transcortin zu finden, das die spezifische Messung

eines bestimmten Glucocorticoids ermöglicht. Die Spezifität der Messung wird, wie bei anderen Bestimmungsmethoden, nur durch vorangegangene Isolierung und Reinigung des zu messenden Steroids herbeigeführt. Ein Vorteil der Proteinbindungsreaktion ist jedoch, daß der Aufwand dieser Reinigungsschritte aufgrund der relativ hohen Bindungsspezifität des Transcortins gering gehalten werden kann.

2.3.2 Durchführung der Proteinbindungsreaktion

2.3.2.1 Materialien und Reagentien

Sämtliche Lösungsmittel waren p.a.-Qualität und wurden vor Gebrauch nochmals destilliert. Lediglich Dioxan (reinst, Merck) wurde zur Herstellung der Scintillationsflüssigkeit ohne weitere Behandlung verwendet. Phosphatpuffer (pH 7,2, 0,15 m mit 0,005 m Natriumazid - das entspricht 2,686 g Kaliumhydrogenphosphat, 8,356 g Dinatriumhydrogenphosphat 2-hydrat und 0,325 g Natriumazid auf 1 l Aqua dest.) wurde stets im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und alle 4 Wochen frisch angesetzt.

Florisil (Korngröße 10 - 100 mesh, Schuchardt) wurde mit Aqua dest. ausgeschüttelt. Nach Beendigung der Durchmischung wurde das überstehende Wasser sofort abgesaugt, um die schebenden Florisilpartikel zu entfernen. Dieser Waschvorgang wurde so lange, meist 5 mal wiederholt, bis alle langsam absinkenden Florisilteilchen entfernt worden waren. Das Florisil wurde dann über Nacht bei 100°C getrocknet.

Holzkohle (Norit A, Partikelgröße 40 - 70 µ) und Dextran (MG 60 000 - 90 000) wurden von der Fa. Serva, Heidelberg bezogen. Zur Beschichtung der Holzkohle mit Dextran wurden 100 mg Dextran in 100 ml Phosphatpuffer gelöst und in dieser Lösung 1 g Holzkohle suspendiert. Diese Kohlensuspension wurde bei 4°C aufbewahrt und jede Woche frisch angesetzt.

Kieselgel mit UV-Indikator (MN-Kieselgel G - HR/UV_{254}) wurde dreimal mit absolutem Methanol gewaschen und anschließend über Nacht bei 100°C getrocknet.

Die Standardsubstanzen Hydrocortison (Merck) und Corticosteron (Merck) wurden durch Vergleichs- und Mischchromatogramme (Papier- und Dünnschicht) sowie durch Ermittlung des Schmelzpunktes auf Reinheit und Identität überprüft. Von beiden Standardsubstanzen wurden Verdünnungsreihen hergestellt, bei denen die entsprechenden Steroidkonzentrationen in 100λ Methanol bzw. 100λ oder 500λ Phosphatpuffer gelöst waren. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C. Die Standardverdünnungen in Puffer wurden alle 4 Wochen frisch bereitet. Die radioaktiv markierten Steroide Corticosteron-1,2-T (spez. Aktivität: 26,2 Ci/mM) und Cortisol-1,2-T (spez. Aktivität: 36,7 Ci/mM) wurden vom Radiochemical Centre Amersham bezogen und ebenfalls papier- und dünnschichtchromatographisch überprüft.

Besondere Geräte und Glaswaren waren 7,7 x 1,4 cm Einweggläser (AR-Normglas), Einweg Pasteurpipetten und sogenannte "Sweep-eluter" (HOFFMANN u. KARG, 1970; MÄRZ, 1971), ausgestattet mit einer G-4-Fritte zum Absaugen und Eluieren des Kieselgels von der Dünnschichtplatte.

Besondere Sorgfalt wurde auf die Säuberung der verwendeten Glaswaren gerichtet. Alle Glaswaren wurden unmittelbar nach Gebrauch mit Leitungswasser und vergälltem Alkohol abgespült und dann für mindestens 12 Std in einer 5 %igen Deconexlösung (Borer Chemie, Solothurn-Schweiz) belassen. Meßkölbchen wurden vorher noch mit Chromschwefelsäure vorgereinigt. Erst dann erfolgte die gründliche mechanische Reinigung mit Bürste und Seifenlösung. Die Gläser wurden dann 20 mal mit Leitungswasser, 3 mal mit Aqua dest. und 1 mal mit Methanol gespült und anschließend im Trokkenschrank getrocknet. Die Sweep-eluter wurden nach Gebrauch mit Methanol gründlich durchgespült und nach einer kurzen Waschung mit Aceton etwa 1 Std bei 100°C getrocknet.

Die Gewinnung der Blutproben erfolgte durch Punktion der Vena jugularis. Bei Schlachthofbullen wurden Proben von dem bei der Entblutung anfallenden Blut genommen. Das Blut wurde in heparinisierten (150λ Liquemin-Roche/50 ml Blut) Zentrifugenbechern aufgefangen, sofort im Eisbad abgekühlt und innerhalb 1 Std bei 4°C und etwa 8000 U/min 15 min lang zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde bis zur weiteren Verwendung bei -18°C aufbewahrt.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Flüssig-Scintillationszähler (Packard, Tricarb 3320). Als Scintillationsflüssigkeit dienten 10 ml Bray's Solution [7 g POP, ,3 g POPOP und 100 g Naphthalin (p.a. Merck) in 1 l Dioxan gelöst - NEILL et al. (1967)]. Die Verwendung dieser Dioxan-Scintillationsflüssigkeit, die zwar die Zählausbeute des Gerätes im Vergleich zum Toluolscintillator von 60 % auf 51,5 % senkte, erlaubte die Zugabe von alkohlischen und wässrigen Lösungen bis zu 500 λ , ohne daß zusätzliche Quencheffekte auftraten.

Die gemessene Radioaktivität wurde in Impulsen pro min (cpm) oder in min/20 000 Impulse angegeben.

2.3.2.2 Ansatz der Transcortinlösung

Als allgemeine Transcortinquelle wurde nach einigen Vorversuchen ausschließlich Hundeplasma verwendet (MURPHY, 1969). Versuche mit Hühnerserum als Transcortinquelle erbrachten, wie schon von MURPHY(1967 a)angegeben, eine geringere Empfindlichkeit der Reaktion für Cortisol im Vergleich zu Hundeplasma. Außerdem wurde die Durchführung der Proteinbindungsreaktion durch fettige Bestandteile des Hühnerserums gestört. Auf weitere Verwendung von Hühnerserum wurde deshalb verzichtet.

Das Hundeplasma, das als Transcortinquelle diente, stammte von Blutspendehunden der Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilian-Universität München[+)].

Das Blut wurde zur Gewinnung des Plasmas, wie in Kap. 2.3.2.1 beschrieben, behandelt. Das Plasma wurde, um mehrmaliges Auftauen zu vermeiden, portionsweise (etwa 3 ml) im Gefrierschrank bei -18°C eingefroren, wo es ohne bemerkbaren Schaden monatelang gelagert werden konnte.

Jede Plasmacharge wurde auf ihre individuelle Bindungskapazität gegenüber Corticosteron-1,2-T, das als radioaktives Tracer-

+)Wir bedanken uns bei der Medizinischen Tierklinik der Universität München für die Blutentnahme bei Hunden für unsere Zwecke.

Steroid in der Proteinbindungsreaktion eingesetzt wurde, überprüft.

Zu diesem Zweck wurde Plasma mit Phosphatpuffer verdünnt. 1,0 ml verschiedener Plasmakonzentrationen (1 %, 2 %, 3 %, 4 % und 6 %) wurden mit einer konstanten Menge (147,2 pg bzw. 0,011/uCi) Corticosteron-1,2-T inkubiert und die Proteinbindungsreaktion, wie in Kap. 2.3.2.3 und Kap. 2.3.2.4 beschrieben, entweder unter Verwendung von Florisil oder von Kohle als Adsorbens durchgeführt.

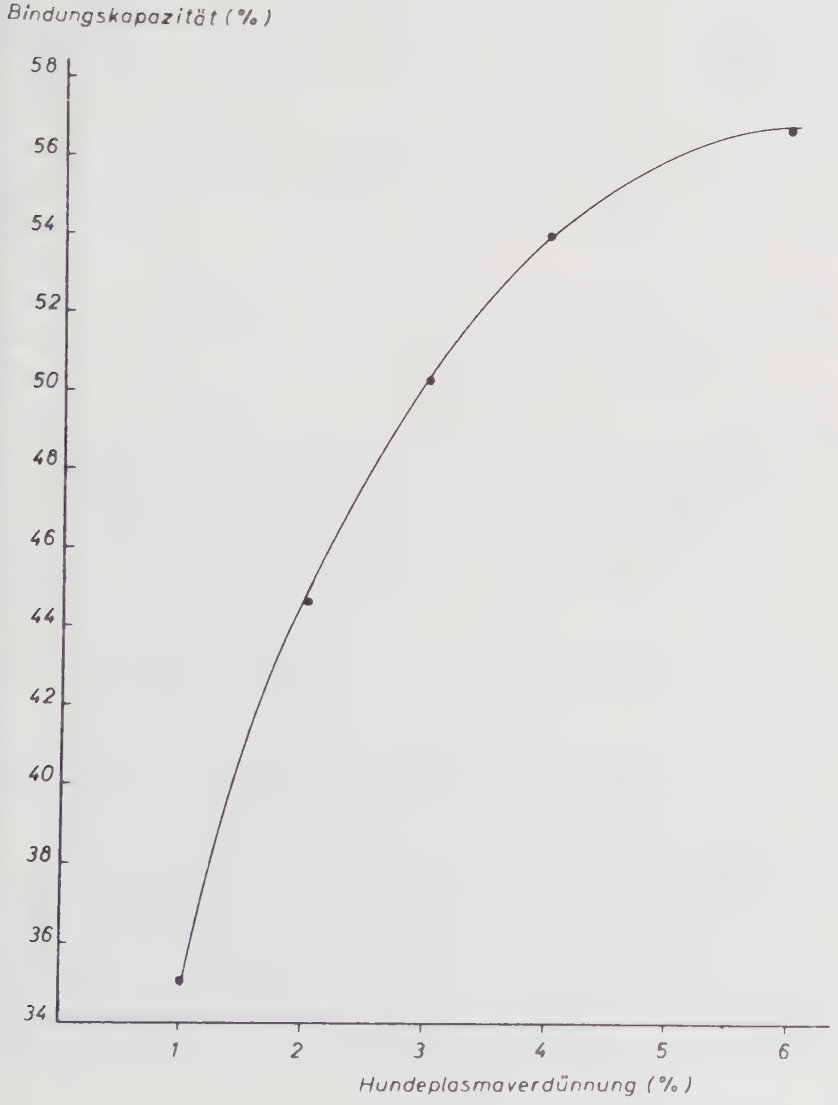
Die Bindungskapazität (BK) des Plasmas für das zugegebene radioaktive Corticosteron berechnete sich aus folgendem Quotienten:

$$BK = \frac{\text{an Plasmaprotein gebundenes Corticosteron-1,2-T (cpm)}}{\text{gesamtes zugegebenes Corticosteron-1,2-T (cpm)}} \times 100$$

In Abb. 5 ist eine derartige "Sättigungskurve" für ein Hundeplasma bei Verwendung des Kohletrennverfahrens dargestellt. Ähnliche Kurven ergaben sich bei Überprüfung aller Plasmaproben von Hunden, die in vorliegender Arbeit verwendet wurden. Um die notwendige Empfindlichkeit der Methode zu gewährleisten, muß bei der Auswahl der Plasmaverdünnung für die Proteinbindungsreaktion darauf geachtet werden, daß das Tracer-Steroid, hier Corticosteron-1,2-T, im Überschuß vorliegt. Für die vorliegende Untersuchung wurde eine 2,5 %ige Plasmakonzentration (Verdünnung 2,57 : 100) ausgewählt (NEILL et al., 1967). Bei dieser Verdünnung wird zwar nur noch 50 % des radioaktiven Corticosterons gebunden (optimal wären es 60 - 70 %), dafür werden aber unspezifische Bindungen an Albumin, die bei höheren Plasmakonzentrationen auftreten, ausgeschlossen.

Zur Herstellung der 2,5 %igen Plasmaverdünnung (CBG-Lösung) für die Proteinbindungsreaktion, wurden 1,114/uCi (oder 14,72 ng) Corticosteron-1,2-T in äthanolischer Lösung (30 λ) in einen Erlenmeyerkolben eingebracht und nach Verdampfen des Lösungsmittels in 2,5 ml Hundeplasma und 97,5 ml Phosphatpuffer aufgenommen.

Abb. 5. Bindung von 147 pg Corticosteron-1,2-T an 1,0 ml eines verdünnten Hundeplasmas unter Verwendung von Holzkohle als Adsorptionsmittel.



Wurde der Test so durchgeführt, daß die Standardsteroide Corticosteron oder Cortisol in 500λ Phosphatpuffer, statt in 100λ Methanol, das ja abgedampft werden mußte, gelöst waren, so wurde die CBG-Lösung in doppelter Konzentration angesetzt. Bei Ansatz des Testes erfolgte dann eine Verdünnung im Verhältnis 1 : 1, wodurch die ursprünglichen Plasmakonzentrationen wieder erreicht wurden. Um zu gewährleisten, daß das gesamte Corticosteron-1,2-T gelöst war, wurde die Plasmaverdünnung erst 1 Std nach dem Ansetzen für den Test verwendet. Die Haltbarkeit dieser Plasmaverdünnung im Kühlschrank bei 4°C war auf höchstens zwei Tage beschränkt. Danach hatten sich die Bindungseigenschaften des Transcortins soweit geändert, daß einwandfreie Eichkurven nicht mehr erhalten wurden.

2.3.2.3 Durchführung der Proteinbindungsreaktion mit Florisil als Adsorbens

Zur Trennung der an Transcortin gebundenen von den ungebundenen freien Steroiden wurde in einer Reihe von Versuchen Florisil verwendet. Die Proteinbindungsreaktion wurde in der für die Progesteronbestimmung von HOFFMANN u. KARG (1970) angegebenen Weise unter strenger Einhaltung des angegebenen Zeitplanes ausgeführt. Dazu wird der Probe (biologischer Extrakt oder Standardsubstanz) 1,0 ml der 2,5 %igen CBG-Lösung, die mit einem Magnetrührer leicht gerührt und deren Temperatur konstant bei 4°C gehalten wird, zugegeben. Die Probe wird dann 10 sec lang an einem "Whirl-Mix" geschüttelt und anschließend in ein Wasserbad von 45°C gebracht. Nach 2,5 min wird sie erneut für 5 sec aufgeschüttelt und nochmals für weitere 3,5 min in das 45°C Wasserbad zurückgestellt. Durch diese relativ hohe Temperatur (45°C) wird gewährleistet, daß die Steroide sicher gelöst werden. Zusätzlich werden aber auch die Dissoziationsvorgänge erheblich beschleunigt. Die Probe wird dann nochmals 10 sec geschüttelt und für 13 min in ein Eisbad gebracht, um das neu entstandene Äquilibrium zu stabilisieren. Anschließend werden 80 (± 0,5) mg Florisil zugegeben und die Probe 1 min lang an einem Laborrührer bei 400 U/min gerührt.

ach weiteren 6 min im Eisbad - in dieser Zeit setzt sich s Florisil mit den daran adsorbierten freien Steroiden - werden 0,5 ml des Überstandes, in dem sich die an das anscortin gebundenen Steroide befinden, zur Bestimmung der adioaktivität in eine Zählküvette verbracht.

ie rationelle Durchführung des Tests, wobei alle 4 min eine ndere Probe der Proteinbindungsreaktion unterzogen wird, rfordert zwei Personen.

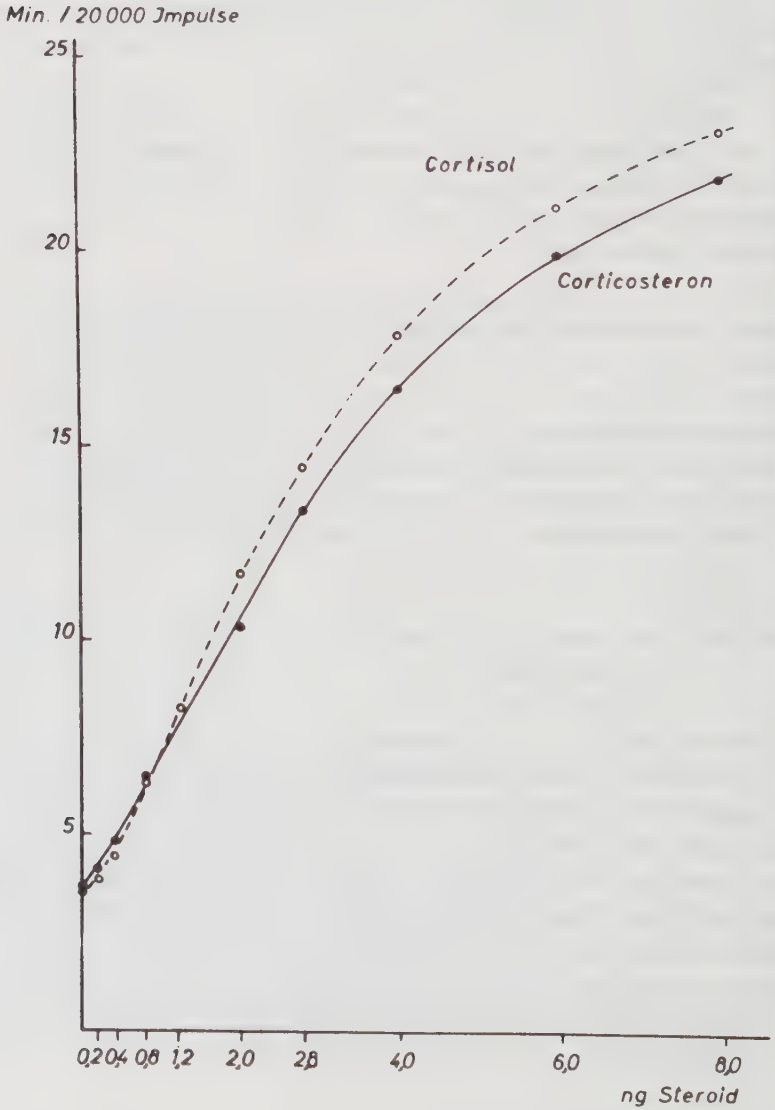
ine geringe Variation des Tests mußte vorgenommen werden, a bei Verwendung von in Methanol (100 λ) gelösten Standard- ubstanzen, die nach dem Einbringen in die Testgläser zur rockne gebracht werden mußten, keine auswertbaren Eichkur- en erhalten wurden.

ies konnte vermieden werden, wenn in Phosphatpuffer gelöste tandardsteroide verwendet wurden. Die abgestuften Steroid- engen waren jeweils in 100 λ Puffer gelöst. Zum Ausgleich urden die niedergetrockneten biologischen Proben vor der roteinbindungsreaktion auch in 100 λ Phosphatpuffer aufge- ommen. Die Proteinbindungsreaktion ergab so einwandfreie nd etwa übereinstimmende Eichkurven für Cortisol und Corti- osteron, wie aus Abb. 6 hervorgeht.

.3.2.4 Durchführung der Proteinbindungsreaktion mit Kohle als Adsorbens

owohl die Proteinbindungsreaktion bei Verwendung von Flori- il über Monate hinweg einwandfreie Eichkurven für in Puffer elöste Standardsubstanzen erbracht hatte, gelang es plötz- lich nicht mehr, diese Kurven zu reproduzieren. Die Ursache urde im Florisil gefunden, dessen Absorptionsvermögen plötz- ich stark herabgesetzt war. Es konnte auch durch zahlreiche schvorgänge (10) nicht zurückerlangt werden. Aus diesem unde wurde eine Proteinbindungsreaktion mit Dextran be- chichteter Holzkohle als Adsorbens aufgebaut.

Abb. 6. Eichkurven für Cortisol und Corticosteron, in 100 λ Phosphatpuffer gelöst, bei Verwendung von Florisil als Adsorbens.

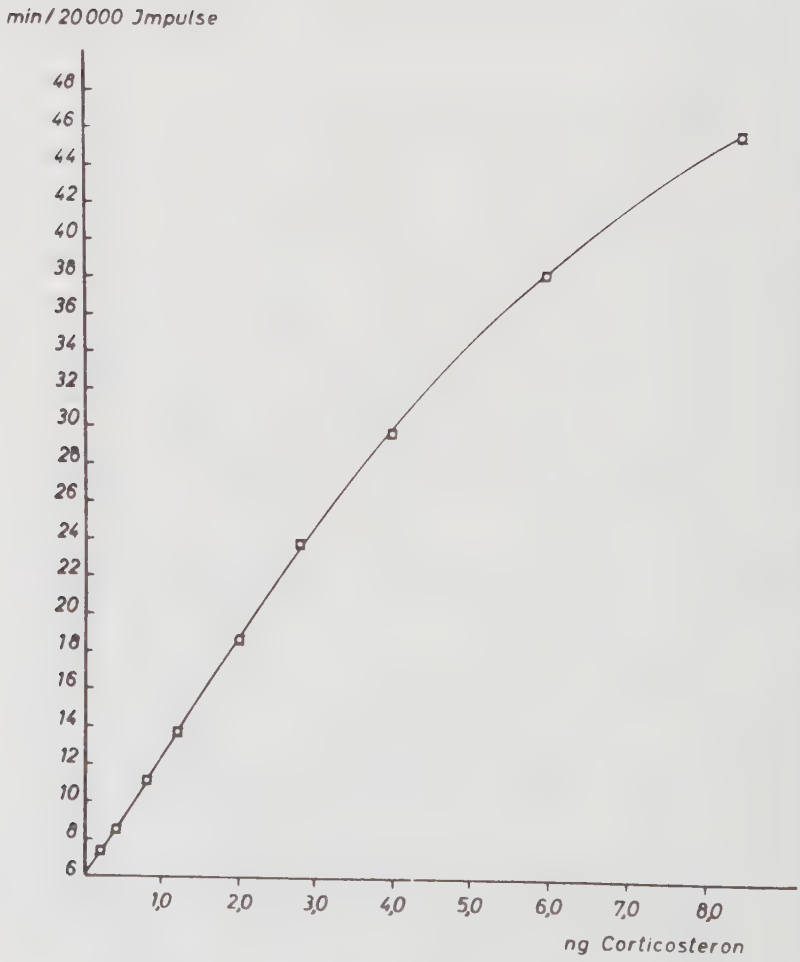


Diese Proteinbindungsreaktion wurde wie folgt durchgeführt: Allen Proben und Standardsubstanzen (Maximal 36), die in 500λ Phosphatpuffer aufgenommen waren, wurden 500 λ der 5 %igen CBG-Lösung (Kap. 2.3.2.2) zugegeben. Darauf wurden sie gemeinsam im Reagenzglasständer 1 min lang mit der Hand gut geschüttelt, 10 min in ein Wasserbad von 45°C gestellt und nochmals geschüttelt. Nach einer Inkubation von 20 min im Eisbad wurden 200λ der Kohlesuspension (Kap. 2.3.2.1) zugegeben, ohne daß der Reagenzglasständer aus dem Eisbad genommen wurde.

Die Proben wurden dann kräftig geschüttelt (1 min), weitere 10 min im Eisbad belassen und dann bei 4°C und 2100 U/min 10 min lang zentrifugiert (Ausschwingrotor). 500λ des Überstandes, der völlig frei von Kohlepartikeln war, wurde zur Bestimmung der Radioaktivität entnommen. Während der Entnahme standen die Proben wieder im Eisbad. Die Erlenmeyerkolben, in denen die CBG-Lösung und die Kohlesuspension angesetzt waren, befanden sich während des Tests ebenfalls in einem Eisbad. Mittels eines Magnetrührers wurde für eine homogene Verteilung der Kohlesuspension gesorgt.

Der oben beschriebene Testablauf erforderte ein rasches Pipettieren bei Zugabe der CBG-Lösung, der Kohlensuspension und bei der Entnahme der 500λ aus dem Überstand, was durch Einsatz halbautomatischer Pipetten (Eppendorf) ermöglicht wurde. Im Gegensatz zum Florisiltest, der ja kein Zentrifugieren erforderte, wurden hier die Proben nicht nacheinander, sondern "im Block" dem Test unterzogen. Um die Zeitspanne, die zwischen der Behandlung der ersten und letzten Probe eines Arbeitsganges verstrich, gering zu halten, wurden neben 10 Standardverdünnungen in zweifachem Ansatz nur maximal 2 mal 8 biologische Proben - insgesamt also 36 Proben - einer Testreaktion unterzogen. Dieser Versuchsablauf ergab einwandfreie Eichkurven mit einer geringen Spannweite bei Doppelbestimmungen, wie am Beispiel einer Corticosteroneichkurve (Abb. 7) ersichtlich ist. Die Eichkurven für

Abb. 7. Eichkurve für Corticosteron, in 500λ Puffer gelöst, bei Verwendung von Dextran beschichteter Holzkohle als Adsorbens (Doppelbestimmung!).



Cortisol und Corticosteron (Abb. 8) weichen jedoch stark von einander ab, obwohl sie das Ergebnis völlig gleicher Versuchsbedingungen, wie identische CBG-Lösung und Kohlensuspension, sind und auch zum gleichen Zeitpunkt erstellt wurden.

2.3.2.5 Vergleich der beiden Verfahren

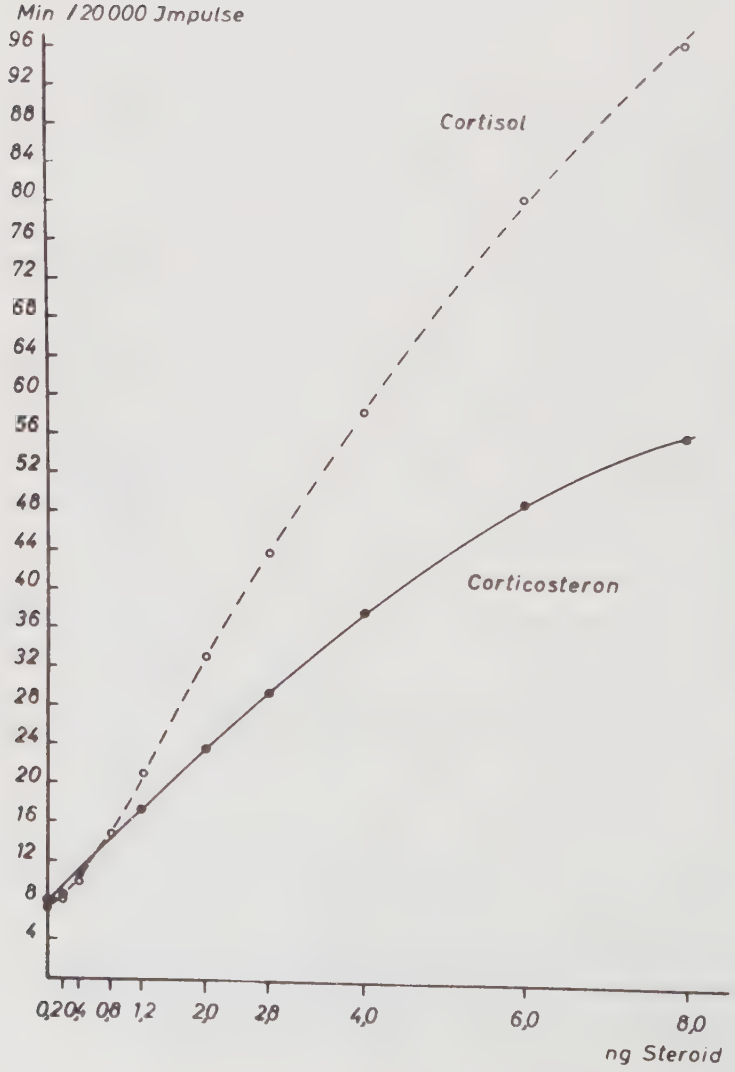
Sowohl mit dem Florisil, als auch mit dem Kohleverfahren war es nicht möglich gewesen, bei Verwendung von in Methanol gelösten Standardsubstanzen auswertbare Eichkurven zu erhalten. Die Unstetigkeit des Kurvenverlaufs war aber bei beiden Verfahren im Fall von Cortisol, dem polareren Steroid, größer als bei Corticosteron. Die genaueren Ursachen dieser Effekte konnten nicht festgestellt werden. Es muß jedoch daran gedacht werden, daß Veränderungen der Steroidmoleküle während des Niedertrocknungsvorganges (Abdampfen von Methanol) oder Adsorptionserscheinungen des Steroids mit der Glasoberfläche hierfür verantwortlich zu machen sind. Dies scheint speziell für die Glucocorticoide zuzutreffen, da im gleichen Laboratorium von HOFFMANN u. KARG (1970) unter Verwendung derselben Geräte und Glaswaren einwandfreie Eichkurven für Progesteron in methanolischer Lösung erhalten wurden.

Hingegen wurden bei Verwendung von in Phosphatpuffer gelösten Standardsubstanzen diese störenden Effekte vermieden. Ebenso konnte diese störende Wirkung bei Plasmaextrakten, die ja auch in den Testgläsern niedergetrocknet werden mußten, nicht beobachtet werden. Diese Tatsache konnte durch spätere Zusatzversuche (siehe Kap. 2.3.4.2) bestätigt werden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse bekräftigen die Ansicht von MURPHY (1970 a), daß bestimmte Plasmafaktoren eine Art "Schutzwirkung" auf das Steroidmolekül ausüben.

Bei der Verwendung von Florisil als Adsorbens wurden für Corticosteron und Cortisol annähernd übereinstimmende Eichkurven erhalten, während bei Anwendung der Dextran beschichteten Holzkohle unterschiedliche Eichkurven zustande kamen.

Abb. 8. Eichkurven für Cortisol und Corticosteron, in 500λ Puffer gelöst, bei Verwendung von Dextran beschichteter Holzkohle als Adsorbens.



Dies dürfte wohl daran liegen, daß durch die stärkeren Adsorptionseigenschaften der Holzkohle die unterschiedliche Affinität des Transcortins zu Corticosteron und Cortisol - wie ja schon von MURPHY (1967 a) beschrieben - sichtbar gemacht werden.

Das Vorkommen von Florisilchargen, die kein oder nur ein geringes Adsorptionsvermögen für Steroide aufweisen, wurde auch von MURPHY (1970 b), LIPSETT et al. (1970) u. JOHANSSON (1970) festgestellt. Obwohl dies in vorliegender Untersuchung der eigentliche Grund für den Wechsel der Adsorbentien war, stellte es sich später heraus, daß die Proteinbindungsreaktion mit Holzkohle gegenüber Florisil, wie sie hier durchgeführt wurde, einige Vorteile aufwies. So konnte die Reaktion von einer einzigen Person durchgeführt werden. Waren allerdings mehr als 8 Doppelproben zu testen, so mußte ein zweiter Test durchgeführt werden. Dies bedeutete aber keinen Zeitverlust gegenüber dem Florisiltest. Außerdem entfiel das zeitaufwendige Abwägen der 80 mg Florisilportionen, da die Kohlesuspension pipettiert wurde.

Die Bemühungen, eine neue, geeignete Florisilcharge zu finden, wurden daher eingestellt und alle weiteren Versuche mit Holzkohle als Adsorbens durchgeführt.

2.3.3 Vorversuche zur Entwicklung eines Extraktions- und Reinigungsverfahrens für Plasmacortisol und -corticosteron

Ausgehend von den Überlegungen im Kapitel 2.3.1.2, daß das Transcortin nur eine relative Spezifität gegenüber Cortisol und Corticosteron aufweist, wurde zur spezifischen Messung dieser beiden Steroide im biologischen Material nach der Extraktion eine chromatographische Auftrennung für notwendig erachtet. Dabei sollten auch andere, die Reaktion beeinträchtigende Steroide abgesondert werden. Hierzu sollte das Rinderplasma zunächst mit Dichlormethan, das allgemein zur

Plasmaextraktion von Glucocorticoiden als gut geeignet gilt (DIXON et al., 1967), extrahiert werden. In dem Extrakt, der sowohl die ursprünglich an Protein gebundenen, als auch die freien Glucocorticoide beinhaltete, sollten dann Cortisol und Corticosteron mittels der Dünnschichtchromatographie, einem relativ einfachen und schnellen Chromatographieverfahren, getrennt werden.

2.3.3.1 Extraktion und Dünnschichtchromatographie

Zur Extraktion wurde 1 ml Rinderplasma mit 5 ml Dichlormethan, das auf Zimmertemperatur gebracht war, in 15 ml Reagenzgläsern mit Schliff 1 min kräftig geschüttelt. Bei Verwendung von gekühltem Dichlormethan (etwa 4°C) bildete sich mit dem Rinderplasma eine Masse von gelartiger Konsistenz, die sich nur durch Zugabe von erwärmtem Dichlormethan und mehrmaligem Zentrifugieren beseitigen ließ. Ansonsten wurde die Trennung der beiden Phasen durch kurzzeitiges Zentrifugieren (5 min bei etwa 2000 U/min, Ausschwingrotor) beschleunigt. Der Dichlormethanextrakt wurde mit einer Pasteurpipette in konische Reagenzgläser abgehebert. Nach einer Nachextraktion mit weiteren 5 ml Dichlormethan wurde der vereinigte Extrakt unter einem Stickstoffstrom bei maximal 40°C niedergetrocknet. Durch Abspülen der Innenwände des Reagenzglases mit einigen Tropfen Methanol wurde die gesamte Probe am Boden des Glases konzentriert, nochmals zur Trockne gebracht und danach mit 2 mal 8 Tropfen Dichlormethan auf die Dünnschichtplatten aufgetragen.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden 20 mal 20 cm Glasplatten verwendet, die in einer Stärke von 0,3 mm mit Kieselgel beschichtet und nach kurzer Luftrocknung 1 Std bei 100°C aktiviert wurden. Die Beschichtung der vorher einwandfrei gereinigten und fettfreien Platten erfolgte mit einem Desaga-Streichgerät. Das Kieselgel wurde dazu mit Aqua dest. im Verhältnis 1 : 2 vermischt.

Vor dem Auftrag der Proben wurden die Platten in 5 gleiche Zonen mit einem kieselgelfreien Zwischenraum von 1 - 2 mm unterteilt. Pro Platte wurden 2 biologische Proben und 3 mal ein Gemisch von 8 µg Corticosteron und Cortisol in methanolischer Lösung so aufgetragen, daß jede biologische Probe beiderseits von Standardsubstanzen umgeben war. Die Platten wurden zunächst in dem System Chloroform : Methanol : Eisessig (= 90 : 5 : 5; UETTWILLER u. KELLER, 1968) entwickelt. Die R_f-Werte von etwa 0,42 und 0,76 für Cortisol bzw. Corticosteron weisen auf eine einwandfreie Trennung dieser Steroide hin. Nach der Entwicklung der Platten wurden die Standardsubstanzen im UV-Licht sichtbar gemacht, die Zonen der biologischen Proben gekennzeichnet und mittels eines Sweep-eluters und 5 ml Methanol als Elutionsmittel direkt in das Testglas (AR-Normglas) eluiert. Bei allen biologischen Proben wurde im Bereich der Corticosteronzonen eine stark UV-positive Zone sichtbar, die vermutlich von Nikotinamid (HOFFMANN et al., 1968) hervorgerufen wurde. Obwohl Untersuchungen ergaben, daß dieses Material von den Plasmaproteinen nicht gebunden wird, wurde ein anderes Chromatographiesystem (Chloroform : Äthanol = 9 : 1) eingeführt, in dem sich dieses UV-positive Material einwandfrei von der Zone des Corticosterons absetzte. Die R_f-Werte im neuen System lagen bei 0,17 und 0,44 für Cortisol bzw. Corticosteron.

2.3.3.2 Interne Standardisierung

Während nach Extraktion des Plasmas die Wiederfindung für Cortisol und Corticosteron in 15 Versuchen konstant bei 97,76 $\pm$ 2,84 % lag, traten nach Einführung des chromatographischen Reinigungsschrittes, sehr unterschiedliche und teilweise auch sehr hohe Aufarbeitungsverluste auf. Sie konnten auch trotz erheblicher Anstrengungen - möglichst gleichmäßige Beschichtung der Dünnschichtplatten und optimale Sättigungsverhältnisse durch Auskleidung des Chromato-

graphietanks mit Chromatographiepapier - nicht verhindert werden. Es wurde deshalb eine interne Standardisierung zur Berechnung der Aufarbeitungsverluste in den einzelnen Proben eingeführt.

Zu diesem Zweck wurden 0,91 m/uCi Corticosteron-1,2-T (12 pg) und Cortisol-1,2-T (9 pg) in jeweils 100 λ Äthanol, das später unter Stickstoff bei 40°C abgedampft wurde, in jedes einzelne Extraktionsglas pipettiert. Gleichzeitig wurde als Ausgangswert für die spätere Berechnung der Wiederauffindung die gleiche Menge radioaktiven Corticosterons und Cortisols in zwei Zählküvetten gebracht und mit Scintillationslösung versetzt. Nach Zugabe von 1,0 ml Rinderplasma in die vorbereiteten Extraktionsgläser wurden die Proben, um eine sichere Verteilung der radioaktiven und endogenen Hormone zu gewährleisten, über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Berechnung der Wiederauffindung erfolgte nach der in Kap. 2.2.1.4 beschriebenen Weise. Eine Umrechnung der relativen Impulszahl (cpm) auf die absoluten Zerfallserscheinungen (dpm) war nicht notwendig, weil die Zählung des anfangs zugegebenen internen Standards (siehe oben) und die der Teilmenge, welche zur Ermittlung der Wiederfindung den Proben entnommen wurde, gleichzeitig im Flüssigkeitsscintillationszähler erfolgte. Die Aufarbeitungsverluste durch Extraktion und Dünnschichtchromatographie lagen für beide Steroide, berechnet aus 57 Versuchen, im Mittel bei etwa 33 %.

Als Ausgleich für die vom internen Standard stammenden Impulse in den biologischen Proben, wurde auch den einzelnen Meßpunkten der Eichkurve eine bestimmte Menge (etwa 800 cpm) radioaktiven Steroids zugegeben. Es ist klar, daß durch die unterschiedlichen Aufarbeitungsverluste der einzelnen biologischen Proben ein absoluter, d.h. 100 %iger Ausgleich für jede einzelne Probe nie erreicht werden kann. Die dadurch entstehenden Ungenauigkeiten können jedoch vernachlässigt werden und stehen in keinem Verhältnis zu den Unregelmäßigkeiten, die bei Unterlassung der Wiederfindungsberechnung für die einzelnen Proben entstehen. Aufgrund der

hen spezifischen Aktivität des radioaktiven internen andards kann auch eine meßbare, quantitative Beeinflus- ng der Proteinbindungsreaktion ausgeschlossen werden.

.3.3.3 Anwendung der beschriebenen Methode bei biologischem Material

Mit dem oben beschriebenen Extraktions- und chromatographischen Reinigungsverfahren wurden zunächst verschiedene Plasaproben auf Cortisol und Corticosteron analysiert. Es wurden Doppel- und Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 dargestellt.

ab. 4. Ergebnisse von Mehrfachbestimmungen im Plasma mit dieser Methode.

obe	Anzahl der Bestimmungen	Corticosteron ng/1,0 ml Plasma ± sd	Cortisol ng/1,0 ml Plasma ± sd	V (%)
h	3	1,84 ± 0,10		5,44
lle+)	8	4,51 ± 0,32		7,10
lbin	2		3,75/ 3,45	-
h	2		5,03/ 4,82	-
h	2		3,90/ 3,69	-
h	3		16,05 ± 1,83	8,60

unter Schlachthofstress

s der Tabelle ist die relativ gute Übereinstimmung der Dopl- und Mehrfachbestimmungen von Corticosteron und Cortisol Plasmaproben ersichtlich. Die geringen Standardabweichungen d) und die daraus berechneten niedrigen Variationskoeffizienn (v) von 5,44 bis 8,60 % sprachen für eine hohe Genauigkeit eser Methode.

wohl die vorgeschlagene Methode an Hand dieser ersten, bei ologischen Proben ermittelten Werte gute Ergebnisse erbracht tte, zeigte es sich, daß bei parallel dazu ausgeführten Zu-

satzversuchen (siehe Kap. 2.3.4.2) keine brauchbaren Resultate erzielt wurden. Deshalb sollte die Methode eingehend auf ihre Zuverlässigkeit überprüft werden.

2.3.4 Die Überprüfung des vorgesehenen Aufarbeitungsganges

Bei der Überprüfung einer Methode muß auf die Zuverlässigkeit, d.h. die Kriterien Richtigkeit (accuracy), Genauigkeit (precision), Empfindlichkeit (sensitivity) und Spezifität (specivity) geachtet werden. Eine absolute Spezifität kann durch die vorliegende Proteinbindungsmethode nicht gewährleistet werden. Hierzu müssen physikalische Bestimmungsverfahren, wie Messung mittels Infrarot- und Massenspektrometer oder die Ermittlung der Magnetischen Kernresonanz angewandt werden. Aber auch bei nicht physikalischen Methoden kann ein hohes Maß an Spezifität erreicht werden.

Die Reproduzierbarkeit, die die Kriterien Genauigkeit, Empfindlichkeit und Richtigkeit beinhaltet, kann u.a. durch Mehrfachbestimmungen, durch Überprüfung des Reagentienleerwertes, durch Zusatzversuche und durch Extraktion gesteigerten Plasmamengen beurteilt werden.

2.3.4.1 Überprüfung des Reagentienleerwertes und Reinigung des Extraktionsmittels

Unter dem Reagentienleerwert versteht man einen äquivalenten Betrag in ng Steroid, der durch Störfaktoren, die mit der Proteinbindungsreaktion interferieren und aus den zur Aufarbeitung verwendeten Lösungsmitteln, Materialien und Geräten stammen, verursacht wird.

Zur Feststellung des Reagentienleerwertes des beschriebenen

Aufarbeitungsganges wurden 10 ml Dichlormethan in einem konischen Reagenzglas niedergetrocknet, chromatographiert und die dem Cortisol- bzw. Corticosteronstandard entsprechenden Zonen der Proteinbindungsreaktion unterzogen.

In 38 Versuchen, die sich über einen längeren Zeitraum erstreckten, wurde für Corticosteron ein Reagentienleerwert von 0,42 (sd $\pm$ 0,37) ng und für Cortisol ein solcher von 0,61 (sd $\pm$ 0,52) ng (30 Versuche) gefunden. Sowohl für Corticosteron als auch für Cortisol ergaben sich damit relativ hohe Reagentienleerwerte. Wegen der hohen Streuung konnten diese Leerwerte nicht zur Korrektur der biologischen Meßergebnisse verwendet werden. Es sollte deshalb zunächst überprüft werden, inwieweit sich das Lösungsmittel Dichlormethan am Zustandekommen dieses Reagentiennullwertes beteiligte.

Hierzu wurden zweimal je 10,0 ml Dichlormethan in Testgläsern niedergetrocknet und die Proteinbindungsreaktion durchgeführt. Der gemessene Wert lag, nach Auswertung an einer Cortisolstandardkurve bei 0,10 und 0,68 ng und entsprach damit den oben angegebenen Werten.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde bei den folgenden Plasmaextraktionen nur 5 ml Dichlormethan verwendet, um den Nullwert zu senken. Dabei zeigte es sich, daß zwar die Wiederauffindung durch die Verwendung einer geringeren Menge an Lösungsmittel nicht beeinflußt wurde, der Reagentienleerwert aber auch nicht. Erst eine Behandlung des Lösungsmittels, wie sie in Kap. 2.2.1.1 für Petroläther beschrieben wurde, wobei lediglich die Behandlung mit Kalimpermanganat unterblieb, und die Aufbewahrung des Lösungsmittels in braunen Flaschen bei 4°C ergab ein gegenüber der Proteinbindungsreaktion völlig inertes Lösungsmittel.

2.3.4.2 Überprüfung der Methode durch Zusatzversuche und die besondere Behandlung des Kieselgels

Hierzu wurde in Methanol gelöstes Cortisol und Corticosteron gemeinsam mit dem radioaktiven internen Standard in die Extraktionsgläser pipettiert. Das Lösungsmittel wurde dann unter einem Stickstoffstrom bei maximal 40°C abgedampft. Nach Zugabe von 1,0 ml Plasma wurden die Proben anschließend bis zur Extraktion über Nacht im Kühlschrank (4°C) inkubiert.

In zahlreichen Versuchen nach dem beschriebenen Aufarbeitungsverfahren (Kap. 2.3.3) gelang es nicht Cortisol oder Corticosteron zufriedenstellend wiederzufinden. Dies geht aus der Zusammenstellung (Tab. 5) hervor.

Tab. 5. Ergebnisse der Zusatzversuche mit dem vorgesehenen Aufarbeitungsgang.

Zusatz (ng)	Corticosteron Anzahl d. Bestimmungen	Mittel d. Wiederfindung (ng)	± sd (ng)	Cortisol Anzahl d. Bestimmungen	Mittel d. Wiederfindung (ng)	± sd (ng)
0,8	9	1,52	0,75	3	1,43	0,44
1,2				3	1,76	0,16
1,6	8	2,84	0,78	3	0,27	0,27
2,0	17	3,10	1,63	11	2,54	1,30
2,8				3	3,98	1,25
4,0	22	5,58	2,16	14	4,53	2,58
6,0	3	5,83	0,79	3	13,32	0,77

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß mit dieser Methode zu viel Steroid wiedergefunden wurde. Noch negativer als die Überschätzung der Werte war für die Beurteilung der Methode jedoch die Tatsache, daß die bei Mehrfachbestimmungen gefundenen Werte erheblich streuten.

Nachdem es bereits auf die im Kap. 2.3.4.1 beschriebene Weise gelungen war, den Lösungsmittelleerwert von Dichlormethan auf 0 ng Cortisol- bzw. Corticosteronäquivalent zu senken, wurde im folgenden der Einfluß der Dünnschichtchromatographie auf dieses Be-

stimmungsverfahren untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Cortisol- und Corticosteron-"Leerzonen" von Kieselgelplatten, die im beschriebenen System entwickelt worden waren, eluiert. Das Eluat aus drei solchen Leerzonen ergab für Corticosteron nach Durchführung der Proteinbindungsreaktion Werte von 0,10 ; 0,25 und 1,90 ng, während für Cortisol Werte von 0,44; 0,60 und 0,74 ng festgestellt wurden.

Dieses Ergebnis machte deutlich, daß bei der Dünnschichtchromatographie Störfaktoren miteluiert wurden, welche die Proteinbindungsreaktion negativ beeinflußten. Dasselbe zeigte sich auch in einem weiteren Versuch, bei dem Standardcortisol und -corticosteron direkt auf die Platte aufgetragen wurden und - nach Entwicklung der Platte und Eluierung - in der Proteinbindungsreaktion gemessen wurden. Trotz Berücksichtigung der Aufarbeitungsverluste wurden 1,6 ng Cortisol mit 0,29; 0,44 und 2,89 ng wiedergefunden. Ähnlich waren die Verhältnisse für Corticosteron, wo für 1,6 ng Zusatz 0,00; 0,37 und 3,14 ng gemessen wurden.

Aus diesen Versuchen geht eindeutig hervor, daß als Folge der Dünnschichtchromatographie die Proteinbindungsreaktion stark beeinträchtigt wurde. Da die Ursache vor allem in der Beschaffenheit des Kieselgels vermutet wurde, wurde statt der bisherigen Waschung des Kieselgels mit destilliertem, kaltem Methanol eine bessere Reinigung durch Auskochen (10 min) in Methanol herbeigeführt. Mit derartig gereinigtem Kieselgel wurde nach Eluierung von Leerzonen und Auswertung über eine Corticosteron-Standardkurve in 9 Versuchen ein Nullwert von $-0,01 \pm 0,13$ ng gefunden.

Obwohl diese sehr niedrigen Reagentiennullwerte bereits auf eine erhebliche Verbesserung der Methode hinwiesen -in einem ersten Zusatzversuch wurden bei einer Doppelbestimmung 1,2 ng Corticosteron signifikant mit 1,21 und 1,29 ng wiedergefunden - verliefen andere Zusatzversuche weniger zufriedenstellend. Um eine weitere Verbesserung der Methode zu erreichen, wurde daher das Kieselgel eine Stunde mit Methanol gekocht, anschließend über einen Büchnertrichter filtriert und noch zweimal mit kochendem Methanol nachgespült. Es wurde dann über Nacht bei 100°C getrocknet.

Bei Verwendung dieses Kieselgels verliefen die Bestimmungen von Corticosteron und Cortisol im Plasma negativ. Sogar der Zusatz von 2,8 ng Corticosteron zu 1,0 ml Plasma ergab in drei Bestimmungen 0 ng Steroid. Diese "Auslöschung" der Steroidwirkung in der Proteinbindungsreaktion konnte erst nach Einführung eines weiteren Reinigungsschrittes in den Aufarbeitungsgang beseitigt werden. Um diese Störfaktoren auszuschließen, wurde nach der Dünnschichtchromatographie das Eluat niedergetrocknet und in 1,0 ml destilliertem Wasser, das zusätzlich über ein Aktivkohlefilter gereinigt worden war, aufgenommen. Die Glucocorticoide wurden dann mit 5,0 ml Dichlormethan extrahiert.

Nach diesem erweiterten Aufarbeitungsgang wurde eine Reihe von Zusatzversuchen durchgeführt.

In Tab. 6 ist das Ergebnis der Zusatzversuche mit Corticosteron dargestellt.

Tab. 6. Wiederfindung von Corticosteron in 1,0 ml Rinderplasma.

Zusatz (ng)	Anzahl der Bestimmungen	Wiederfindung Mittelwert (ng)	sd bzw. Doppelbestimm. (ng)	v (%)	in % des Zusatzes (%)
0,8	2	0,45	0,40/0,50	-	56
1,6	9	1,89	± 0,56	29,6	118
4,0	10	3,94	± 0,47	11,9	98,5
6,0	2	5,87	6,23/5,51	-	98

Wie aus der Zusammenstellung in Tab. 6 hervorgeht, wurden die Zusätze ab 1,6 ng Corticosteron relativ gut wiedergefunden. Die Reagentienleerwerte betrugen in allen Fällen 0 ng Corticosteronäquivalent.

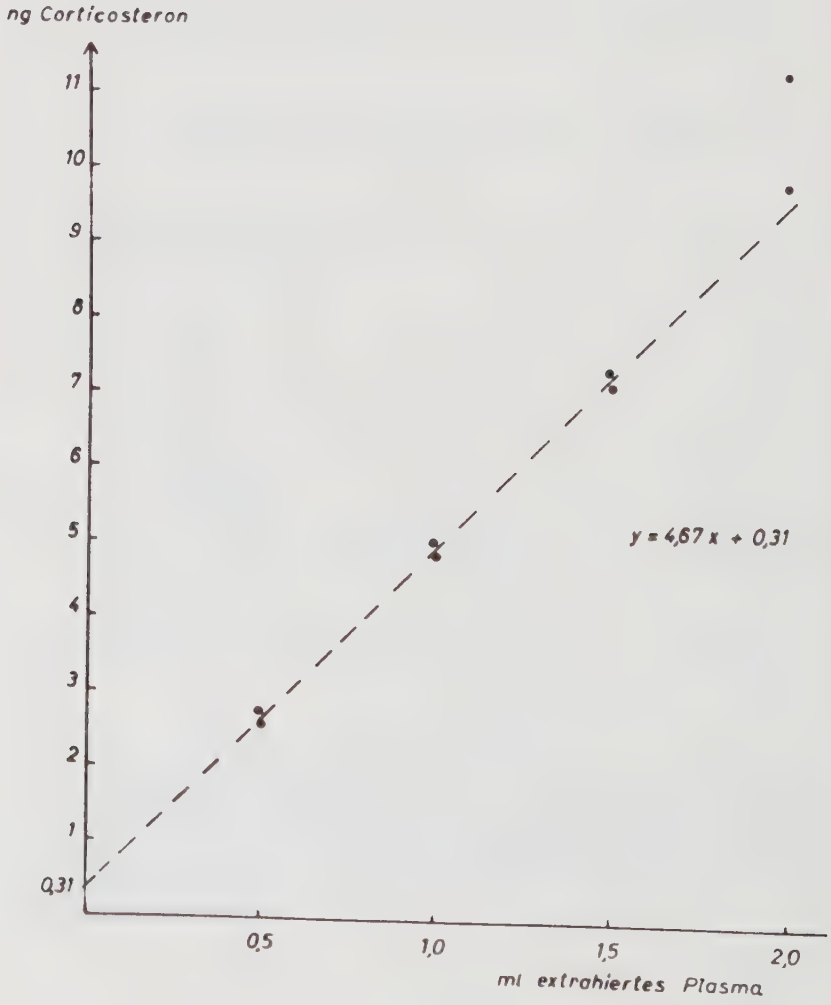
Bei Anwendung dieses Aufarbeitungsganges für die Cortisolbestimmung wurden, im Gegensatz zur Corticosteronanalyse, keine zufriedenstellenden Ergebnisse bei Zusatzversuchen erhalten. Für die Cortisolbestimmung erbrachte die zusätzliche Behandlung des Dichlormethans und des Kieselgels im Vergleich zum ursprünglichen Verfahren keinen Fortschritt. In allen Fällen kam die verdrängende Wirkung des Cortisols in der Proteinbindungsreaktion nicht mehr zur Geltung.

2.3.4.3 Überprüfung der Methode durch Extraktion gesteigerter Plasmamengen

Nachdem es durch die oben beschriebenen Verbesserungen des Aufarbeitungsganges gelungen war, den Reagentienleerwert der Methode auf 0 ng Corticosteronäquivalent zu senken, war es möglich geworden, auch den Plasmanullwert zu ermitteln. Dies kann am zuverlässigsten durch Extraktion des Plasmas adrenal- und gonadektomierter Rinder geschehen. Da kein solches Plasma zur Verfügung stand, mußte ein indirekter Weg eingeschlagen werden. Das Entfernen von Glucocorticoiden aus normalem Plasma durch Adsorption an Holzkohle oder durch Extraktion mit Lösungsmitteln führt nicht zu diesem Ziel, weil damit auch Faktoren entfernt werden können, die für den Nullwert des Plasmas verantwortlich sind. Aus diesem Grunde wurde im folgenden versucht, ob durch Extraktion gesteigerter Plasmamengen auf das Vorhandensein eines Plasmanullwertes geschlossen werden kann.

Mit der in Kap. 2.3.5 zusammengefaßten Methode wurde in unterschiedlichen Plasmamengen einer bestimmten Blutprobe (Bulle unter Schlachthofstress) Corticosteron bestimmt. Das Resultat dieses Versuches ist in Abb. 9 gezeigt.

Abb. 9. Corticosteronbestimmung - Extraktion unterschiedlicher Plasmamengen (Plasma eines Schlachthofbullen).



Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, stellt die Regressionskurve der einzelnen Meßpunkte eine Gerade ($y = 4,67 x + 0,31$; berechnet nach Documenta Geigy, S. 170.5, Nr. 634) dar, die die Ordinate bei 0,31 ng Corticosteron schneidet. Aufgrund dieser Tatsache und der sehr geringen Spannweite der Doppelbestimmungen, mit Ausnahme eines einzigen Meßpunktes, verhalten sich extrahiertes Plasmavolumen und gemessene Menge Corticosteron streng proportional. Demnach ist der Wert von 0,31 ng als der Nullwert dieser Plasmaprobe anzusehen. Jeder einzelne Meßpunkt ist um diesen konstanten Betrag erhöht. Nach Subtraktion des Nullwertes von den einzelnen Meßpunkten errechnet sich ein Mittelwert von 4,56 ng Corticosteron/1,0 ml Plasma für die 7 Meßpunkte, die im Bereich der Regressionsgeraden liegen. Die Standardabweichung beträgt $\pm$ 0,13 ng, was zu einem sehr niedrigen Variationskoeffizienten von 2,84 % führt.

Drei Tage später wurde dieser Versuch mit demselben Plasma wiederholt. Das obige Ergebnis konnte bestätigt werden. Als Plasmanullwert wurden 0,42 ng Corticosteronäquivalent festgestellt. Allerdings kann der hier errechnete Plasmanullwert nicht auf alle Proben übertragen werden, da in späteren Versuchen Plasmakonzentrationen unter 0,10 ng Corticosteron ermittelt wurden.

2.3.4.4 Beurteilung der Methode

Im Verlauf der Vorversuche kristallisierte sich eine Methode zur Corticosteronbestimmung heraus, welche die in Kap. 2.3.4 angeführten Kriterien für die Zuverlässigkeit einer Methode in hohem Maße erfüllt.

Wird die Empfindlichkeit (sensitivity) einer Methode als die untere Nachweisgrenze definiert, so wird diese im vorliegenden Fall zunächst durch den Reagentienleerwert von 0 ng Corticosteronäquivalent festgelegt. Weiter wird die Nachweisgrenze durch den Plasmanullwert bestimmt. Ein für alle Proben geltender Plasmanullwert kann nicht angegeben werden. Er kann je-

doch, wie in Kap. 2.3.4.3 gezeigt wurde, bis zu 0,4 ng Corticosteronäquivalent betragen.

Die Richtigkeit (accuracy) der Methode ergibt sich aus den Zusatzversuchen. Da erst ab einem Zusatz von 4,0 ng Corticosteron eine zufriedenstellende Wiederfindung (98,5%) mit geringen Streuungen (v = 11,9 %) gefunden wurde, ist die Richtigkeit der Methode aufgrund der Zusatzversuche erst ab Plasmakonzentrationen von etwa 4 ng gewährleistet.

Die Genauigkeit (precision) der Methode kann aufgrund der Mehrfachbestimmungen als sehr hoch bezeichnet werden, da eine Probe in 7 Bestimmungen (Mittelwert: 4,56 ng Corticosteron/1,0 ml Plasma) einen Variationskoeffizienten von v = 2,84 % aufwies.

Diese hohe Genauigkeit, die auch bei Plasmakonzentrationen unter 1,0 ng Corticosteron gegeben war, steht in gewisser Hinsicht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Zusatzversuche, nach denen die Richtigkeit der Methode erst ab Konzentrationen von 4 ng gewährleistet ist. Außerdem weisen die Schwierigkeiten, die beim Zusatz von in 500λ Phosphatpuffer gelöstem Standardcorticosteron auftraten, - die Zusätze in Puffer konnten im Gegensatz zum Standardcorticosteron, das in Methanol gelöst war,nicht zufriedenstellend wiedergefunden werden - erneut auf das unterschiedliche Verhalten von Standardsteroiden und endogenen Plasmasteroiden hin (siehe Kap. 2.3.2.5). Aus diesen Gründen ist anzunehmen, daß die Richtigkeit der Methode auch bei Corticosteronwerten unter 4,0 ng gegeben ist.

Die Spezifität der Methode wird zunächst durch die Bindungseigenschaften des Transcortins bestimmt. Nachdem, wie MURPHY (1967 a) zeigen konnte, Transcortin der Spezies Hund neben Cortisol und Corticosteron auch 11-Desoxycortisol, Cortisol, Progesteron und 17-Hydroxyprogesteron in erheblichem Umfang bindet, ist eine spezifische Messung dieser Steroide nur

ann möglich, wenn sie vor der Proteinbindungsreaktion iso-
iert wurden. Bei dem entwickelten Aufarbeitungsgang zur Be-
timmung von Corticosteron wurden die interferierenden Steroi-
e dünnschichtchromatographisch abgetrennt. Unspezifische Fak-
oren aus dem Material und den Reagentien konnten ausgeschlos-
sen werden (Reagentienleerwert gleich 0 ng Steroidäquivalent).
Als einzige Unspezifität blieb der Plasmanullwert, der z.B.
für ein bestimmtes Rinderplasma mit etwa 0,4 ng Corticosteron-
äquivalent errechnet wurde. Ob dieser Blindwert durch unbekann-
te Steroide oder andere Plasmafaktoren hervorgerufen wird, ist
unbekannt.

2.3.5 Endgültiges Verfahren zur spezifischen Bestimmung von Corticosteron

In den Kapiteln 2.3.3 und 2.3.4 wurde die Entwicklung einer Methode zur spezifischen Corticosteronbestimmung beschrieben. Sie wird im folgenden zusammenfassend dargestellt.

Materialien und Reagentien: Dichlormethan (p.a.) wird, wie in Kap. 2.2.1.1 für Petroläther beschrieben, gereinigt, wobei lediglich die Behandlung mit Kaliumpermanganat unterbleibt. Nach der Destillation des Lösungsmittels wird es in braunen Flaschen bei 4°C aufbewahrt. Da eine solche Lagerung chemische Veränderungen des Dichlormethans immer noch nicht verhindern kann, muß der Reinigungsvorgang alle 10 Tage wiederholt werden. Destilliertes Wasser wird über ein Aktivkohlefilter nochmals gereinigt, Kieselgel mit UV-Indikator (MN-Kieselgel G-HR/UV_{254}) wird 1 Std mit destilliertem Methanol gekocht und im Filter noch dreimal mit kochendem Methanol nachgewaschen. Für alle übrigen Materialien und Reagentien gelten die in Kap. 2.3.2.1 bereits beschriebenen Voraussetzungen.

Extraktionsgang: Nach Zugabe des internen Standards (siehe Kap. 2.3.3.2) werden die Plasmaproben - immer 1,0 ml - auf

die in Kap. 2.3.3.1 beschriebene Weise mit 5,0 ml Dichlormethan extrahiert.

Der Extrakt wird in einem N_2-Strom bei maximal 40°C eingeengt und anschließend, wie im gleichen Kapitel im Detail dargelegt, auf Kieselgelplatten im System Chloroform : Äthanol = 9 : 1 chromatographiert. Nach Lokalisation der Corticosteronzone mittels Vergleichsstandard im UV-Licht wird diese mit Hilfe eines Sweep-eluters und 5,0 ml Methanol in ein 15 ml Reagenzglas mit Schliff eluiert. Das Eluat wird wieder im N_2-Strom niedergetrocknet. Es schließt sich dann eine Lösungsmitteltrennung zwischen 1,0 ml Aqua dest. und 5,0 ml Dichlormethan an (siehe Kap. 2.3.4.2). Die Dichlormethanfraktion, in der das endogene Corticosteron gelöst ist, wird in das Testglas abgehebert, niedergetrocknet und in 1,0 ml Methanol aufgenommen. Nach Entnahme von 200 λ zur Berechnung der Wiederfindung, wird das Lösungsmittel der Restprobe (800 λ) verdampft und die Probe in 500 λ Phosphatpuffer aufgenommen. Anschließend wird die in Kap. 2.3.2.4 beschriebene Proteinbindungsreaktion unter Verwendung einer 5 %igen CBG-Lösung und mit Dextran beschichteter Holzkohle als Adsorbens durchgeführt. Den Standardwerten der Eichkurve wird als Ausgleich zum internen Standard der biologischen Proben radioaktives Corticosteron zugegeben, dessen Menge aufgrund der Wiederfindungsberechnung festgesetzt wird (Kap. 2.3.3.2).

2.3.6 Verfahren zur Messung der "Gesamtcorticoide"

2.3.6.1 Definition der "Gesamtcorticoide"

Da in der Nebenniere des Rindes neben Cortisol und Corticosteron auch zahlreiche andere Glucocorticoide gefunden wurden (Kap. 1.1.4) ist anzunehmen, daß diese zu einem gewissen Teil auch im peripheren Blutkreislauf vorhanden sind.

Von einer Messung der Gesamtcorticoide kann man also nur sprechen, wenn es gelingt, alle diese Glucocorticoide in einem Meßverfahren quantitativ zu erfassen. Im folgenden werden zu den "Gesamtglucocorticoiden" lediglich die Glucocorticoide gerechnet, die im Dichlormethanextrakt einer Plasmaprobe vorhanden sind und dann direkt in einer Proteinbindungsreaktion gemessen werden. Der gemessene Wert wird in einem äquivalenten Nanogrammbetrag des zur Eichkurve verwendeten Steroids angegeben. Da das Transcortin unterschiedliche Affinitätskonstanten gegenüber den einzelnen Glucocorticoiden aufweist (MURPHY, 1967 a), kann mit dieser Methode keine absolut quantitative, jedoch eine physiologische Aussage gemacht werden. Dies ist auch aus der Tatsache ersichtlich, daß bei der Verwendung von Hundeplasma als Transcortinquelle und Holzkohle als Adsorbens unterschiedliche Eichkurven für Cortisol und Corticosteronstandard erhalten wurden (siehe Abb. 8). Die qualitative Aussage bei der Bestimmung der "Gesamtcorticoide" wird demnach auch durch das verwendete Adsorbens beeinflußt, das, je nach Adsorptionseigenschaften, die Steroid-Protein-Bindung unterschiedlich beeinflußt. In den vorliegenden Versuchen zeigte sich dies beim Vergleich der Adsorbentien Florisil und Holzkohle. Während sich bei der Verwendung von Florisil als Adsorbens annähernd identische Eichkurven ergaben (siehe Abb. 6), wurden mit Holzkohle, wie oben schon geschildert, stark unterschiedliche Eichkurven erhalten. Bei der Bestimmung der "Gesamtcorticoide" sind deshalb nur solche Meßergebnisse miteinander vergleichbar, die unter identischen Versuchsbedingungen zustande kamen.

2.3.6.2 Aufarbeitungsgang und Durchführung der Proteinbindungsreaktion zur Bestimmung der "Gesamtcorticoide"

Zur Kontrolle der Aufarbeitungsverluste wurde auch bei der Bestimmung der "Gesamtcorticoide" ein interner Standard benützt. Falls die Auswertung der Endmessung an Hand einer Corti-

soleichkurve beabsichtigt war, wurden 0,91 m/uCi Cortisol-1,2-T als interner Standard verwendet. Bei Auswertung mittels einer Corticosteroneichkurve wurde die gleiche Impulsmenge radioaktiven Corticosterons zugegeben. 0,5 ml Plasma wurden mit dem internen Standard über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit 5,0 ml Dichlormethan, wie in Kap. 2.3.5 angegeben, extrahiert. Der unter N_2 niedergetrocknete Extrakt wurde in 1,0 ml Methanol aufgenommen. Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte durch Entnahme von 500λ, während je nach der zu erwartenden Corticoidmenge 100λ bis 500λ der restlichen Probe in der Proteinbindungsreaktion gemessen wurden. Die Proteinbindungsreaktion wurde mit Kohle als Adsorbens ausgeführt.

Wie in Kap. 2.3.3.2 beschrieben, erfolgte auch hier ein Ausgleich für den radioaktiven internen Standard beim Ansatz der Standardkurve.

2.3.6.3 Charakterisierung des Verfahrens zur Bestimmung der "Gesamtcorticoide"

Das vorliegende Verfahren zur Bestimmung der "Gesamtcorticoide" sollte wiederum gemäß den Zuverlässigkeitskriterien Spezifität und Reproduzierbarkeit überprüft werden.

Die nur relative Spezifität dieser Methode geht bereits aus den Darlegungen im Kap. 2.3.6.1 hervor. Um die dort getroffenen Überlegungen zu unterstreichen, daß nämlich die mit einer solchen Methode gefundenen Ergebnisse keine absoluten Meßwerte darstellen, sondern nur Vergleichswerte sind, wurde folgender Versuch durchgeführt: Mit den Extrakten aus dem Plasma einer Kalbin wurde die Proteinbindungsreaktion durchgeführt, wobei der Test nach Corticosteron- und nach Cortisolstandardwerten ausgewertet wurde. Das Ergebnis dieses Versuches (Test 1) und seine Wiederholung sieben Tage später (Test 2), ist aus Tab. 7 ersichtlich.

Tab. 7. Bestimmung der "Gesamtcorticoide" bei Auswertung nach Cortisol- und Corticosteroneichkurve.

Auswertung nach	"Gesamtcorticoide"(ng/1,0 ml Plasma) Test 1	Test 2	Mittelwert	± sd	v(%)
Cortisol-standard	6,56/7,14	7,90/8,44	7,51	0,82	10,9
Cortico-steron-standard	10,5/10,9	11,2/13,5	11,53	1,36	11,8

Die unterschiedlichen Ergebnisse für die "Gesamtcorticoide" zeigen deutlich, daß mit dieser Methode keine spezifische Messung möglich ist.

Gleichzeitig ließ dieser Versuch Rückschlüsse auf die Reproduzierbarkeit der Methode zu. Bei einem Variationskoeffizienten von 11,8 bzw. 10,9 % in 4 Bestimmungen ist die Genauigkeit dieser Methode in diesem Konzentrationsbereich festgelegt. Die 8fache Bestimmung der "Gesamtcorticoide" (Auswertung nach einer Cortisoleichkurve) in einer anderen Plasmaprobe erbrachte einen Mittelwert von 5,84 ± 0,55 ng und einen Variationskoeffizienten von 9,4 %. Die Genauigkeit der Methode wird demnach durch einen Variationskoeffizienten von etwa 10 % charakterisiert.

An Hand von Zusatzversuchen wurde die Richtigkeit der Methode überprüft. Die Ergebnisse der Zusatzversuche sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Tab. 8. Wiederfindung von Cortisol- und Corticosteronzusätzen bei der Bestimmung der "Gesamtcorticoide".

Zusatz Cortisol oder Corticosteron (ng)	Anzahl der Bestimmungen	Wiederfindung Mittelwert (ng)	± sd (ng)	v (%)	in (%) des Zusatzes
1,6	8	2,00	1,21	60,7	125
4,0	12	5,03	1,96	39,0	126
8,0	12	8,25	1,44	17,4	103

Aus Tab. 8 geht hervor, daß die Zusätze erst ab einer Konzentration von 8,0 ng Steroid gut wiedergefunden wurden. Aufgrund dieser Wiederfindung ist eine zufriedenstellende Richtigkeit der Messung erst ab einer Steroidkonzentration von 8,0 ng Gesamtcorticoid im Extrakt gewährleistet. Das hochgereinigte Dichlormethan (Kap. 2.3.5) erbrachte für diese Methode einen Lösungsmittelleerwert von 0 ng Gesamtcorticoidäquivalent. Unter dieser Voraussetzung konnte wieder der Plasmanullwert durch Extraktion gesteigerter Plasmamengen ermittelt werden. In 4 Parallelansätzen wurden 0,25; 0,50; 1,0 und 1,5 ml Plasma extrahiert. Die Auswertung des Tests erfolgte nach einer Cortisol- bzw. Corticosteronstandardkurve. Da in beiden Fällen als Regressionskurve einwandfrei eine Gerade gefunden wurde, die nicht durch den Schnittpunkt der Koordinaten verlief, wurde für diese Plasmaprobe einer Kalbin ein Nullwert von + 0,23 ng bei Auswertung nach einer Cortisolstandardkurve und - 0,85 ng "Gesamtcorticoid" unter Bezugnahme auf eine Corticosteroneichkurve festgestellt. Damit wird der Plasmanullwert für diese Methode der Gesamtcorticoidbestimmung auf maximal ± 1,0 n geschätzt. Er stellt gleichzeitig die untere Nachweisgrenze der Methode dar.

3. ANWENDUNG DER PROTEINBINDUNGSMETHODE BEI DER BESTIMMUNG DER GLUCOCORTICOIDE IM RINDERPLASMA

3.1 Tiermaterial

Die Tierversuche wurden auf dem Versuchsgut Veitshof durchgeführt. Es standen Kühe und Kalbinnen der Rasse "Deutsches Braunvieh" zur Verfügung. Die Tiere waren die Blutabnahme gewohnt und zeigten im allgemeinen keine Unruheerscheinungen. Wurde Plasma benötigt, das von Tieren unter Stresseinfluß stammen sollte, so wurde Blut von Höhenfleckviehbullen bei der Schlachtung am Schlachthof gesammelt.

3.2 Allgemeine Plasmawerte von Rindern mit und ohne Stresseinfluß

Nachdem keine endgültige Methode zur routinemäßigen Cortisolbestimmung entwickelt werden konnte, liegen nur wenige einwandfreie Ergebnisse vor. So wurden im Plasma von 2 Kühen bei Dreifachbestimmung im Mittel 2,69 bzw. 16,05 ng Cortisol/ml Plasma gefunden. Diese Ergebnisse müssen als gesichert angesehen werden, da sie mit parallel durchgeführten Zusatzversuchen ermittelt wurden, in denen die Wiederfindung für Cortisol zufriedenstellend ausfiel. In einem Bullenplasma (Schlachthofstress) wurde in einer vierfachen Bestimmung die obere Meßgrenze der Eichkurve überschritten. Damit waren in dieser Probe mindestens 20 ng Cortisol/1,0 ml Plasma enthalten. In denselben Plasmaproben wurde neben Cortisol auch Corticosteron bestimmt. 1,0 ml Plasma der Kühe erbrachte Corticosteronwerte von 0,82 ng (3 Bestimmungen) bzw. 0,39 ng (7 Bestimmungen). Im Blut des Bullen wurden 4,51 ng Corticosteron/1,0 ml Plasma bei einer achtfachen Bestimmung gefunden.

Hieraus läßt sich ein Cortisol zu Corticosteronverhältnis von 3 : 1 bzw. 40 : 1 bei den Plasmaproben der Kühe errechnen. Im Falle des Bullenplasmas ist dieses Verhältnis etwa 5 : 1.

Die spezifische Messung von Corticosteron im Plasma von graviden Kalbinnen und Kühen,die nicht unter wahrnehmbarem Stress standen, ergab sehr niedrige Werte. Bei einer sechsfachen Bestimmung wurden im Plasma einer Kalbin (Kalbin 1) im Mittel 0,34 ng Corticosteron/ml Plasma gefunden. In einer anderen Probe (Kalbin 2) wurden 0,14 ng Corticosteron/ml Plasma (5 Bestimmungen) gemessen, während eine dritte Probe (Kalbin 3) 0,09 ng/ ml Plasma in 3 Messungen erbrachte.

Diese im Vergleich zu anderen Spezies äußerst niedrigen Corticosteronkonzentrationen im peripheren Rinderblut gaben Veranlassung, im Plasma solcher Rinder Corticosteron zu messen, von denen angenommen werden konnte, daß sie unter Stresseinfluß standen. Die Bestimmung von Corticosteron im Plasma eines Schlachthofbullen ergab tatsächlich, verglichen mit den Kalbinnen, einen signifikant höheren Wert. Im Mittel von 16 Bestimmungen wurden 5,28 ng (sd = $\pm$ 0,56) Corticosteron/ml Plasma gemessen.

Bei Entwicklung der Methode zur Bestimmung der "Gesamtcorticoide" konnten in 1,0 ml Plasma der Kalbin 1 (siehe oben), je nach Auswertung über Corticosteron- oder Cortisolstandardwerte, 11,53 ng bzw. 7,51 ng "Gesamtcorticoid"/ml Plasma gemessen werden. Eine vierfache Bestimmung im Plasma der Kalbin 2 ergab, bezogen auf Corticosteron-Standard, 4,88 ng "Gesamtcorticoid"/ml Plasma. Da in den gleichen Plasmaproben die Corticosteronkonzentration gemessen worden war (siehe oben), konnte das Corticosteron zu "Gesamtcorticoid"-Verhältnis errechnet werden. Es lag bei 1 : 34; 1 : 22 und 1 : 54. Diese Verhältniszahlen liegen in einem ähnlichen Größenbereich, wie die oben errechneten Verhältnisse von Corticosteron zu Cortisol.

3.3 Glucocorticoide um den Geburtszeitpunkt am Beispiel der Kuh "Zilla"

Im Rahmen der Vorversuche zur Entwicklung eines Verfahrens zur spezifischen Bestimmung von Corticosteron und Cortisol wurden beide Steroide im Plasma einer Kuh (Zilla) vor und nach der Geburt gemessen. Beginnend 14 Tage vor der Geburt wurden in 24 stündigem Abstand (jeweils um 5^{00} Uhr früh) Blutproben bis einschließlich 7 Tage post partum entnommen. In Abb. 10 ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt.

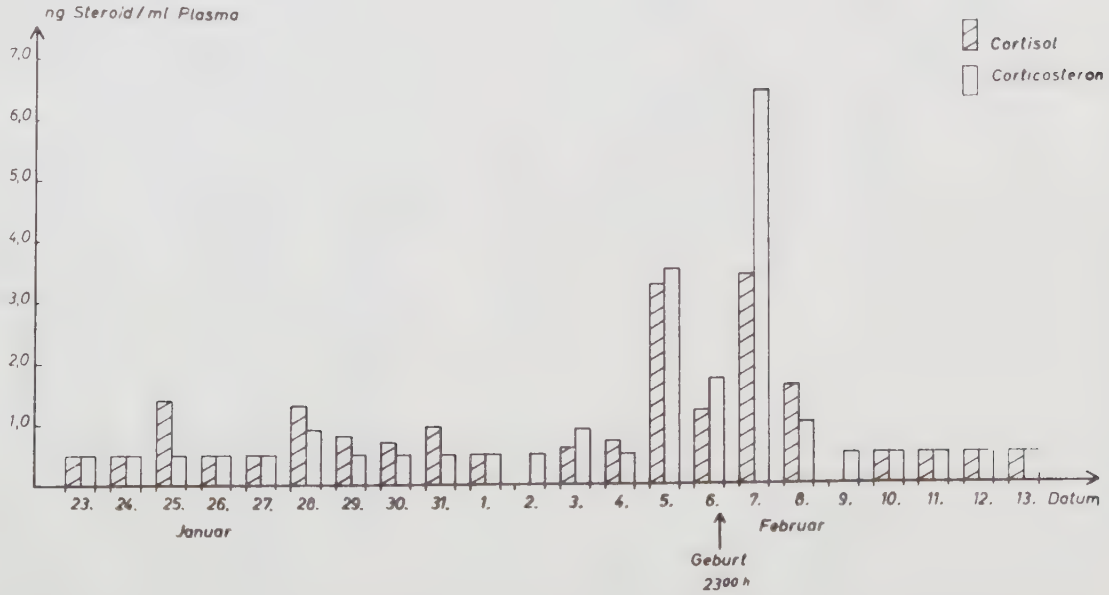
Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, liegt bei dieser Kuh das Corticosteron zu Cortisolverhältnis etwa bei 1 : 1. Die gemessenen niedrigen Konzentrationen, meist unter 1,0 ng, stiegen einen Tag vor der Geburt auf Werte über 3 ng/ ml Plasma an. Während sie am Tag der Geburt wieder etwas abgefallen waren, erreichten sie einen Tag post partum mit 6,43 ng Corticosteron und 3,40 ng Cortisol/ml Plasma maximale Werte. Bereits 2 Tage post partum waren die Ausgangswerte wieder erreicht.

3.4 Veränderung des Glucocorticoidspiegels nach Verabreichung von ACTH

Nachdem bis jetzt höhere Corticosteronwerte nur in Plasma von Rindern, die unter Stresseinfluß standen, gemessen wurden, wurde untersucht, inwieweit durch Verabreichung von exogenem ACTH ein Anstieg des endogenen Corticosterons herbeigeführt werden kann.

Einer nicht graviden Kuh ("Roni") wurden 500 I.E. ACTH in wässriger Lösung (II. Internationaler Standard, Acethropan-Hoechst) intramuskulär verabreicht. Unmittelbar vor der Injektion wurde durch Punktion der Vena jugularis eine

Abb.10 Cortisol- und Corticosteronkonzentrationen im peripheren Blut der Kuh "Zilla" vor und nach der Geburt



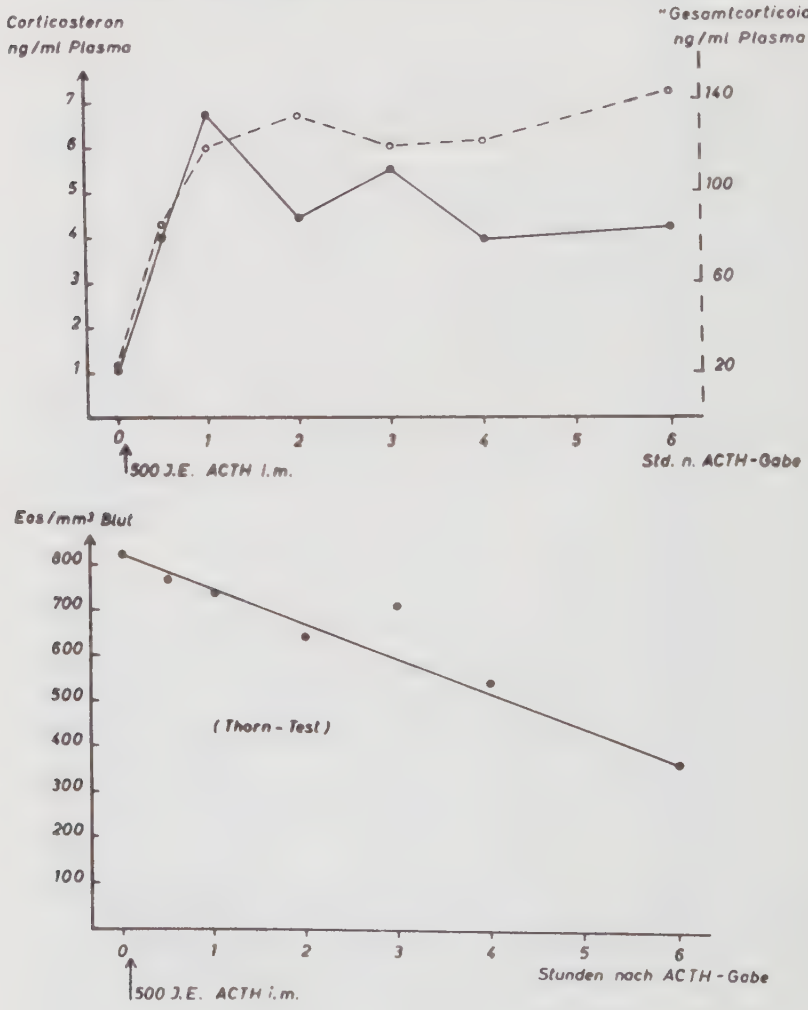
Blutprobe genommen. Die weiteren Blutentnahmen erfolgten 0,5; 1; 2; 3; 4; und 6 Std nach der Injektion. In den einzelnen Blutproben wurde sofort nach der Probenahme die Konzentration der eosinophilen Granulozyten (Thorntest) in der von KARG (1955) angegebenen Weise bestimmt. Danach wurde das Plasma gewonnen und bis zur Analyse der Glucocorticoide bei -18°C aufbewahrt (vgl. Abb. 11).

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, lag der Ausgangswert für die"Gesamtcorticoide", die nach einer Corticosteronstandardkurve ausgewertet wurden, bei 23,8 ng/ml Plasma, während für Corticosteron ein sehr viel niedrigerer Ausgangswert von 1,1 ng/ml Plasma gemessen wurde. Für die graphische Darstellung (Abb. 11) mußten daher unterschiedliche Maßstäbe (Verhältnis 1 : 20) angewendet werden. Durch die ACTH-Injektion wurde ein sofortiger Anstieg des Corticosterons und der Gesamtcorticoide bewirkt. Bereits nach 30 min war die Konzentration in beiden Fällen um den Faktor 4 - 5 angestiegen, 60 min post injectionem war das Maximum der Corticosteronkonzentration (6,84 ng/ml Plasma) erreicht. Auch die "Gesamtcorticoid"-Konzentration stieg von diesem Zeitpunkt an nur noch unwesentlich von 119,5 ng/ml Plasma auf 145,2 ng/ml Plasma (6 Std post injectionem).

Nach diesem Zeitpunkt (1 Std post injectionem) zeigte die Corticosteronkonzentration eine abfallende Tendenz. 6 Std nach der Injektion war der Corticosteronwert jedoch immer noch um das vierfache der Ausgangskonzentration erhöht. Die Konzentration der "Gesamtcorticoide" blieb dagegen auf dem nach 2 Std erreichten Niveau von etwa 135 ng/ml Plasma stehen. Das Verhältnis Corticosteron zu "Gesamtcorticoid" variierte in diesem Versuch zwischen 1 : 18 und 1 : 35.

Im Gegensatz zur raschen Reaktion der Glucocorticoide auf die ACTH-Injektion wurde diese Injektion nur mit einem sehr langsamen, aber linearen Abfall der eosinophilen Granuolzyten im peripheren Blut beantwortet. Erst nach 6 Std war die Konzentration dieser Zellen auf 44 % des Ausgangswertes abgesunken.

Abb.11 Bestimmung von Corticosteron, der "Gesamtcorticoide" und der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut der Kuh "Roni" nach einer ACTH - Injektion



4. D I S K U S S I O N

4.1 Diskussion der Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Hormone Corticosteron und Cortisol im peripheren Blut beim Rind spezifisch zu bestimmen. Wie schon eingangs im Literaturteil erwähnt, kommen den Glucocorticoiden nicht nur im intermediären Stoffwechsel, sondern auch im Fortpflanzungsgeschehen wichtige Aufgaben zu. Um die Funktion der Glucocorticoide besser erkennen zu können, ist jedoch die oben angeführte Spezifität der Messung unbedingte Voraussetzung.

In den ersten Messungen wurde versucht, die herkömmlichen colorimetrischen Bestimmungsmethoden der Tetrazoliumblau- und der Porter-Silber Farbreaktion anzuwenden. Die Unspezifität dieser Meßverfahren konnte jedoch bald, wie in Kap. 2.2.4 ausführlich dargestellt, nachgewiesen werden. Hieraus ergibt sich auch, daß die zahlreichen, in der Literatur angeführten Meßwerte der Glucocorticoidkonzentrationen, die mit der Porter-Silber Farbreaktion ermittelt wurden, kritisch überprüft werden müssen (ROBERTSON u. MIXNER, 1956; BRUSH, 1958; SHAW et al., 1960; SHAW u. NICHOLS, 1962 u. 1963; HENDRICKX, 1962). Nach den neueren Befunden liegen diese Werte zu hoch. Lediglich PATERSON (1957) bei Verwendung der Porter-Silber Reaktion und SABA (1964), der ein Fluoreszenzverfahren benützte, maßen niedrige Cortisolkonzentrationen (etwa 1 µg/100 ml Plasma), die den neueren Messungen mit Proteinbindungsmethoden entsprechen (siehe Kap. 1.1.4).

Nach dem Scheitern der photometrischen Verfahren schien die Anwendung einer kompetitiven Proteinbindungsreaktion für die Bestimmung der Glucocorticoide erfolgversprechender. Die Proteinbindungsmethode wurde bereits in Kap. 2.3.1.2 eingehend diskutiert. Es soll hier lediglich noch einmal darauf hingewiesen werden, daß bei Verwendung von Transcortin als Bindungsprotein die Spezifität des Meßverfahrens durch chromato-

graphische Reinigungsschritte vor der eigentlichen Reaktion abgesichert werden muß, d.h. Cortisol muß von Corticosteron und beide Steroide müssen von weiteren, die Proteinbindungsreaktion beeinflussenden Steroiden und störenden Faktoren abgetrennt werden. Es zeigte sich jedoch, daß bei Durchführung der chromatographischen Reinigung zur Erlangung der geforderten Spezifität große Schwierigkeiten auftraten. Besonders die Verwendung von Kieselgel als Adsorbens erwies sich als Quelle für zahlreiche Störungen. Wie in Kap. 2.3.4 geschildert, konnte erst nach Vorreinigung des Extraktionsmittels, Waschung des Kieselgels mit kochendem Methanol und Behandlung des Eluats der Kieselgelplatte mit Aqua dest. ein befriedigendes Verfahren für die Corticosteronbestimmung aufgebaut werden. Auf die Spezifität und Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens wurde in Kap. 2.3.4.4 eingegangen. Da der Reagentienleerwert bei 0 ng lag, war es möglich, geringste Corticosteronmengen qualitativ zu erfassen. Nach den Ergebnissen der Zusatzversuche (Tab. 6) waren jedoch exakte quantitative Messungen erst ab Konzentrationen von 1,6 ng/ml Plasma möglich. Für diesen Meßbereich lag der Variationskoeffizient bei 29,6 %, während er im Bereich von 4 ng/ml Plasma nur noch 11,9 % betrug. Eine sehr viel bessere Präzision der Messung war bei Bestimmungen im Plasma gegeben, dem kein Corticosteronstandard zugegeben wurde. Hier wurde in einer 7fachen Bestimmung ein Variationskoeffizient von 2,84 % bei einer mittleren Corticosteronkonzentration von 4,56 ng/ml Plasma gefunden. Aus dieser Tatsache ergibt sich, daß die Beurteilung einer Methode nicht nur aufgrund von Zusatzversuchen vorgenommen werden darf.

Während für Corticosteron ein spezifisches, reproduzierbares Meßverfahren entwickelt werden konnte, gelang es nicht, Cortisol im Routinetest spezifisch zu bestimmen. Obwohl sich Corticosteron und Cortisol nur durch die 17α-Hydroxylgruppe unterscheiden, wurde in zahlreichen Versuchen die angewandte Proteinbindungsmethode bei der Cortisolbestimmung durch noch vorhandene Störfaktoren negativ beeinträchtigt. Wie im Ergebnisteil (Kap. 3.2) bereits erwähnt, wurden Cortisolwerte nur dann

als einwandfrei angesehen, wenn parallel dazu durchgeführte Zusatzversuche zufriedenstellend ausfielen.

Bei den beschriebenen Meßverfahren für Corticosteron und bei den Versuchen zur Bestimmung von Cortisol wurde ein interner Standard zur Berechnung der individuellen Aufarbeitungsverluste eingesetzt. Bei Durchführung der Proteinbindungsreaktion erwies sich, wie in Kap. 2.3.2.5 geschildert, Holzkohle als geeigneteres Adsorbens als Florisil, das im Laufe der Zeit seine Adsorptionsaktivität verloren hatte.

Da es nicht gelang, für Cortisol ein routinemäßiges Bestimmungsverfahren auszuarbeiten, wurden ersatzweise die "Gesamtcorticoide" bestimmt. Das Verfahren ist in Kap. 2.3.6.2 beschrieben. Wie zu erwarten, ist dieses Verfahren jedoch wesentlich unempfindlicher, als das für die Corticosteronmessung entwickelte, da hier nach der Extraktion keine weiteren Reinigungsschritte mehr vorgenommen wurden. Eine zufriedenstellende quantitative Messung ist, wie aus den Zusatzversuchen (Tab. 8) entnommen werden kann, erst ab etwa 8 ng "Gesamtcorticoid" möglich (v = 17,4 %). Ähnlich wie bei der Corticosteronbestimmung, wurden auch hier mit biologischem Material bessere Ergebnisse erzielt. So ergab eine 8fache Bestimmung einer Probe (5,84 ng/ml Plasma) einen Variationskoeffizienten von 9,4 %.

Bei der Messung der "Gesamtcorticoide" muß berücksichtigt werden, daß Transcortin verschiedene Affinität gegenüber den im Plasma vorhandenen Glucocorticoiden aufweist (MURPHY, 1967 a). Dies geht auch eindeutig aus der vorliegenden Untersuchung hervor, da unter völlig gleichen Versuchsbedingungen für Corticosteron und Cortisol unterschiedliche Standardkurven erzielt wurden (siehe Abb. 8). Je nachdem, ob die Gesamtcorticoide nach Corticosteron- oder Cortisolstandardkurven ausgewertet wurden, ergaben sich deshalb unterschiedliche Meßwerte (Tab. 7). Die Analyse der "Gesamtcorticoide" ergibt keine absolut quantitativen Werte, sondern die gemessenen Konzentrationen können

lediglich in Cortisol- oder Corticosteronäquivalenten ausgedrückt werden. Dieses Verfahren eignet sich jedoch sehr gut, um physiologische Aussagen treffen zu können. So konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden (Abb. 11), daß die "Gesamtcorticoide" parallel zum Corticosteron mit einem Konzentrationsanstieg auf ACTH reagieren. Die Spezifität der Gesamtcorticoidmessung kann, abhängig vom physiologischen Zustand des untersuchten Rindes, durch andere mitextrahierte Steroide, wie Progesteron und 17-Hydroxyprogesteron, negativ beeinflußt werden. Hier könnte daran gedacht werden, Progesteron größtenteils und teilweise auch 17-Hydroxyprogesteron durch eine vorausgehende Petrolätherextraktion zu entfernen(MURPHY, 1967a, 1969 u. 1970a), durch die die Glucocorticoide Corticosteron und Cortisol nicht erfaßt werden (JOHANSSON et al., 1968; HOFFMANN, persönliche Mitteilung).

Die Schwierigkeiten, die bei der Bestimmung der Glucocorticoide auftraten, stehen im engen Zusammenhang mit den niedrigen Glucocorticoidkonzentrationen im Plasma, die beim Rind im Gegensatz zu anderen Spezies angetroffen werden. So ist einer Zusammenstellung von DIXON et al. (1967) zu entnehmen, daß im normalen menschlichen Plasma 45 - 195 ng Cortisol/ml Plasma bzw. 12 ng Corticosteron/ml Plasma mit Doppelisotopentechniken gefunden wurden. MAICKEL et al. (1969) berichten über Corticosteronkonzentrationen von etwa 160 ng/ml Plasma bei Ratten. LINDNER (1964) stellte beim Meerschweinchen Konzentrationen von Cortisol plus Corticosteron um 130 ng/ml Plasma fest. Auch beim Pferd werden bedeutend höhere Glucocorticoidkonzentrationen angetroffen, als bei den Wiederkäuern. HOFFSIS et al. (1970) fanden Werte um 50 ng "Gesamtcorticoid"/ml Plasma bei normalen Pferden ohne Stresseinfluß.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Mit dem beschriebenen Verfahren der kompetitiven Proteinbindungsmethode wurden zu verschiedenen physiologischen Zeitpunkten die Glucocorticoidkonzentrationen im peripheren Rinderblut ermittelt. Soweit Corticosteron und Cortisol spezifisch in der gleichen Probe gemessen werden konnten, lag das Verhältnis von Cortisol zu Corticosteron zwischen 0,53 :1 und 40 : 1. In der Literatur werden Verhältniszahlen von 0,85 : 1 bis 15,4 : 1 (siehe Kap. 1.1.4) genannt. Aus den vorliegenden Versuchen geht hervor, daß dieses Verhältnis noch zu eng gesetzt ist. Das Cortisol zu Corticosteronverhältnis liegt aber auf keinen Fall konstant bei etwa 1 : 1, wie dies im Jahr 1951 bei Perfusionsstudien von HECHTER et al. gefunden wurde und seither in verschiedenen Arbeiten angegeben wird (BUSH, 1953 a u. 1953 b).

Auffallend bei den durchgeführten Analysen waren die meist sehr niedrigen Corticosteronkonzentrationen. Sie lagen fast immer unter 0,5 ng/ml Plasma. Lediglich bei Schlachthofbullen, die eindeutig unter Stress standen, wurden Corticosteronwerte um 5 ng/ml Plasma gemessen. Diese Beobachtung und die Tatsache, daß nach einer ACTH-Gabe (500 I.E.) die Konzentration des Corticosterons parallel zu den "Gesamtcorticoiden" auf den 7fachen Ausgangswert stieg, stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von VENKATASESHU u. ESTERGREEN (1970), die nach einer ACTH-Injektion (200 I.E.) nur einen Anstieg des Cortisols nachweisen konnten. Der Befund dieser Autoren dürfte sich hauptsächlich aus der angewandten Methodik ergeben, da vor der ACTH-Injektion bereits eine Corticosteronkonzentration von etwa 40 ng/ml Plasma gemessen wurde. Ob diese sehr hohen Corticosteronwerte durch den Stress der Blutabnahme - es wurden pro Analyse 1 bis 2 l Blut benötigt - oder durch hohe Reagentienleerwerte des Aufarbeitungsganges hervorgerufen wurden, bleibt dahingestellt.

Der Anstieg des gemessenen Corticosterons und der Gesamtcorticoide erreichte bereits nach 1 Std Maximalwerte (siehe Abb. 11). Im Gegensatz dazu war bei dem parallel dazu durchgeführten Thorntest die Konzentration der eosinophilen Granulozyten erst nach 6 Std auf 44 % des Ausgangswertes abgefallen. Der Thorntest erwies sich demnach als ungeeignet, beim Rind die sich rasch ändernden Glucocorticoidkonzentrationen anzuzeigen.

Das etwa konstante Konzentrationsverhältnis (1 : 20) von Corticosteron zu "Gesamtcorticoid" liegt innerhalb der Spannweite de gefundenen Corticosteron zu Cortisolverhältnisse.

Ähnlich hohe Corticosteronwerte, wie bei Bullen unter Schlachthofstress oder bei ACTH-Gabe, wurden bei einer Kuh um den Geburtszeitpunkt gemessen. Die konstant niedrigen Basiswerte von meist unter 0,5 ng Corticosteron und etwa 1,0 ng Cortisol/ml Plasma stiegen 42 Std vor der Geburt auf etwa 3,5 ng Corticosteron bzw. Cortisol/ml Plasma an. Der Maximalwert lag bei 6,4 ng Corticosteron und 3,4 ng Cortisol/ml Plasma 6 Stunden post partum. Am 2. Tag nach der Geburt war das Ausgangsniveau der Glucocorticoidkonzentrationen praktisch schon wieder erreicht. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen von ADAMS u. WAGNER (1970), die ebenfalls um die Geburt einen Anstieg der Glucocorticoide messen konnten. Allerdings haben diese Autoren lediglich die Gesamtcorticoide bestimmt, wobei vor der Geburt ein höheres Plateau als nach der Geburt ermittelt wurde. Es ist möglich, daß diese Differenz durch mitgemessenes Progesteron bei den Vorgeburtswerten erklärt werden kann. Physiologisch können diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den in Kap. 1.1.5.3 zitierten Befunden über die Bedeutung der Glucocorticoide bei der Geburtsauslösung beim Rind gesehen werden.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, spezifische Meßverfahren für Corticosteron und Cortisol im peripheren Rinderblut zu entwickeln.

1. Anwendung colorimetrischer Meßverfahren:

   Die Unspezifität dieser Verfahren (Tetrazoliumblau- und Porter-Silber Farbreaktion) konnte im Verlauf der ersten Untersuchungsreihe eindeutig nachgewiesen werden. Trotz Einführung zahlreicher chromatographischer Reinigungsschritte konnte bei Anwendung der Tetrazoliumblau-Farbreaktion, bezogen auf 100 g Gesamtblut, kein konstanter Meßwert erhalten werden. Die Porter-Silber Reaktion ergab lediglich direkt in einem ungereinigten Blutextrakt positive Meßwerte. Bereits nach einem säulenchromatographischen Reinigungsschritt lag der Meßwert bei 0 µg bzw. außerhalb des Meßbereiches.

2. Anwendung der Proteinbindungsreaktion zur Bestimmung von Plasmacorticosteron und -cortisol:

   Für die Bestimmung von Plasmacorticosteron konnte ein hochspezifisches und empfindliches Meßverfahren bei relativ geringem Arbeitsaufwand entwickelt werden. Zusätze von 1,6 ng bis 6,0 ng Corticosteron konnten im Plasma signifikant wiedergefunden werden. Mehrfachbestimmungen von Plasmaproben ergaben bei einem Variationskoeffizienten von etwa 10 % gut übereinstimmende Meßwerte. Die beschriebene Methode wurde durch Faktoren aus Materialien und Reagentien nicht beeinträchtigt.

   Im Gegensatz zur Messung von Corticosteron konnte das beschriebene Verfahren für die routinemäßige Cortisolbestimmung nicht angewandt werden, da in zahlreichen Versuchen Faktoren unbekannter Art bei der Proteinbindungsreaktion interferierten. Aus diesem Grunde waren zahlreiche Wiederholungsversuche

notwendig, um einwandfreie Meßwerte in biologischem Material zu erhalten.

3. Anwendung der Proteinbindungsreaktion bei der Bestimmung von "Gesamtcorticoiden"

Dieses Verfahren, bei dem die in einem Dichlormethanextrakt des Plasmas vorhandenen Glucocorticoide erfaßt werden, wurde angewandt, um die Schwierigkeiten bei der Cortisolbestimmung zu umgehen. Es konnte gezeigt werden, daß mit dieser Methode aufgrund der unterschiedlichen Affinität der einzelnen Glucocorticoide zu Transcortin keine quantitativen Aussagen getroffen werden können. Physiologisch relevante Aussagen sind jedoch mit diesem Verfahren berechtigt.

4. Anwendung der beschriebenen Proteinbindungsmethoden im biologischen Material:

In insgesamt 23 Versuchen konnten Corticosteron und Cortisol parallel in denselben Blutproben bestimmt werden. Das gemessene Cortisol zu Corticosteronverhältnis schwankte zwischen 0,53 : 1 und 40 : 1. Auffallend bei der Messung des Corticosterons waren die sehr niedrigen Plasmakonzentrationen von Rindern, die nicht unter Stresseinfluß standen. Sie verliefen innerhalb eines Bereiches von 0,09 ng bis maximal 0,82 ng/ml Plasma. Demnach scheint Cortisol beim Rind das vorherrschende Glucocorticoid zu sein.

Im Verlauf der Untersuchungen wurden Corticosteron und Cortisol bei einer Kuh vor und nach der Geburt bestimmt. Eine deutliche Erhöhung der Glucocorticoidkonzentrationen um den 6fachen Ausgangswert 42 Stunden ante partum wurde festgestellt. Dieser Anstieg der Glucocorticoide wird im Zusammenhang mit dem Geburtsauslösemechanismus des Rindes diskutiert.

Im Gegensatz zu den Befunden von VENKATASESHU u. ESTERGREEN (1970) konnte gezeigt werden, daß auch beim Rind die Corticosteronkonzentration im peripheren Blut durch ACTH angehoben wird. Der Corticosteronanstieg verlief dabei parallel zur Konzentration der "Gesamtglucocorticoide".

SUMMARY

Experiments were carried out for the development of specific methods for the determination of cortisol and corticosterone in bovine peripheral blood.

1. Application of colorimetric methods of assay

   The unspecificity of these methods (blue tetrazolium and Porter-Silber color reaction) could clearly be demonstrated during the first series of experiments. When using the blue tetrazolium reaction no constant values - calculated per 100 g blood - were obtained although several chromatographic purification procedures were introduced into the method. When using the Porter-Silber reaction positive values could only be measured in a not further purified blood extract; after carrying out only one column chromatography zero values were obtained.

2. Application of competitive protein binding procedures for the determination of plasma cortisol and corticosterone

   For the determination of plasma corticosterone a relatively brief, but highly specific and sensitive method was developed. 1,6 ng and 6,0 ng corticosterone added to plasma were recovered significantly. Multiple determinations in plasma samples showed good agreement with a coefficient of variation around 10 %. The described method was not influenced by materials and reagents used. Contrary to the determination of corticosterone, the described method could not be applied for the routine determination of cortisol, since in many experiments the protein binding reaction was disturbed by hitherto unknown factors. To get acceptable results with biological material, many experiments had therefore to be repeated.

3. Application of competitive protein binding procedures for the determination of "total corticosteroids"

To avoid the difficulties arising in the specific measurement of cortisol, "total corticosteroids" were determined. Glucocorticoids, extracted from plasma with methylene chloride, are measured without further purification. It was demonstrated, that this method - due to the different affinities of glucocorticoids to transcortin - gave no absolute quantitative, but physiological results.

4. Application of the described protein binding procedures to biological material

In 23 experiments corticosterone and cortisol could be assayed in identical blood samples. The range of the calculated corticosterone to cortisol varied between 0,53 : 1 and 40 : 1. Notable low concentrations of 0,09 ng up to maximally 0,82 ng corticosterone/ml plasma were found in animals not influenced by stress situations. Thus cortisol seemed to be the dominant glucocorticoid in the bovine species.

During the experiments corticosterone and cortisol were measured in a cow before and after delivery. A significant elevation of both steroids (factor 6) 42 hours prior to parturition was observed. This rise of glucocorticoids is discussed in connection with the mechanisms initiating parturition in the bovine.

In contrast to the observations of VENKATASESHU and ESTERGREEN (1970), it was demonstrated, that also the bovine species ACTH causes an increase of corticosterone in peripheral blood. Corticosterone and "total glucocorticoids" were increasing parallel.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abelson, D. u. Bondy, P.K. 1955
Fluorometric determination of Δ^4-3-ketosteroids
Arch. Biochem. Biophys. 57, 208

Adams, W.M. 1969
The elective induction of labor and parturition in cattle
J. Amer. Vet. Med. Ass. 154, 261

Adams, W.M. u. Wagner, W.C. 1970
The role of corticoids in parturition
Biol. Reprod. 3, 223

Allen, W.M. 1950
A simple method for analyzing complicated adsorption curves, of use in the colorimetric determination of urinary steroids
J. Clin. Endocrinol. Metab. 10, 71

Ayres, P.J.; Simpson, A. u. Tait, J.F. 1957
A fluorescence method for the microanalysis of Δ^4-3-oxo-steroids on paper chromatograms
Biochem. J.65, 647

Bailey, E. 1964
The use of gas-liquid chromatography in the assay of some corticosteroids in urine
J. Endocrinol. 28, 131

Balfour, W.E.; Comline, R.S. u. Short, R.V. 1959
Changes in the secretion of 20α-hydroxypregn-4-en by the adrenal gland of young calves
Nature 183, 467

Basset, J.M. u. Hinks, N.T. 1969
Micro-determination of corticosteroids in ovine peripheral plasma: effects of venipuncture, corticotrophin, insulin and glucose
J. Endocrinol. 44, 387

Bassett, J.M. u. Thorburn, G.D. 1969

Foetal plasma corticosteroids and the initiation of parturition in sheep

J. Endocrinol. 44, 285

Baulieu, E.E.; Raynaud, J.P. u. Milgrom, E. 1970

Measurement of steroid binding proteins
In: Steroid assay by protein binding

Hrsg.: Diczfalusy, E.; Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, Stockholm, S. 104

Beitins, I.Z.; Kowarski, A.; Shermeta, D.W.; Delemos, R.A. u. Migeon, C.J. 1970a

Foetal and maternal secretion rate of cortisol in sheep: diffusion resistance of the placenta

Pediat. Res. 4, 129

Beitins, I.Z.; Shaw, H.; Kowarski, A. u. Migeon, C.J. 1970 b

Comparson of competitive protein binding radioassay of cortisol to double isotope dilution and Porter-Silber methods

Steroids 15, 765

Binns, W.; James, L.F.; Shupe, J.L. u. Thacker, E.J. 1962

Cyclopian-type malformation in lambs

Arch. Environ. Health 5, 106

Bischoff, F. u. Pilhorn, H.R. 1948

The state and distribution of steroid hormones in biologic systems. III. Solubilities of testosterone, progesterone, and α-estradiol in aqueous salt and protein solution and in serum

J. Biol. Chem. 174, 663

Booth, M.; Dixon, P.F.; Gray, C.H.; Greenaway, J.M. u. Holness, N.J. 1961

Protein binding of cortisol in health and in pregnancy

J. Endocrinol. 23, 25

Brown, M.F.; Hildalgo, M.A., Sickles, J.S. u. Jöchle,W. 1970

Synthetic corticosteroid induction of parturition in cows

Symp. Dtsch. Ges. Endocrin. 16, 303

Brush, M.G. 1958
Adrenocortical activity in bovine pregnancy and parturition
J. Endocrinol. 17, 381

Bush, I.E. 1952
Methods for paper chromatography of steroids applicable to the study of steroids in mammalian blood and tissues
Biochem. J. 50, 370

Bush, I.E. 1954
The possibilities and limitations of paper chromatography as a method of steroid analysis
Recent Prog. Horm. Res. 9, 321

Bush, I.E. 1953 a
Species differences in adrenocortical secretion
J. Endocrinol. 9, 95

Bush, I.E. 1953 b
Species differences and other factors influencing adrenocortical secretion
Ciba Found. Colloq. Endocr. 7, 210

Bush, I.E. 1961
The chromatography of steroids
Pergamon Press, Oxford

Butte, J.C. u. Noble, E.P. 1968
Simultaneous determination of plasma or whole blood cortisol and corticosterone
Acta Endocrinol. 61, 678

Chen, C. u. Tewell, H.E., Jr. 1951
Corticosteroid determination with blue tetrazolium BT
Fed. Proc. 10, 377

Clark, B.R. u. Rubin, R.T. 1969
New fluorometric method for the determination of cortisol in serum
Anal. Biochem. 29, 31

Clark, B.R.; Rubin, R.T.; Kales, A. u. Poland, R. 1970

Comparison of fluorometric method for urinary cortisol with modified Porter-Silber method for 17-OHCS

Clin. Chim. Acta 27, 364

Coghlan, J.P.; Wintour, M. u. Scoggins, B.A. 1966

The measurement of corticosteroids in adrenal vein blood of sheep

Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44, 639

Daughaday, W.H. 1957

Corticosteroid binding by a plasma alpha globulin (abstract)

J. Clin. Invest. 36, 881

Daughaday, W.H. 1958a

Binding of corticosteroids by plasma proteins. III. The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasmaprotein fractions as measured by equilibrium dialysis

J. Clin. Invest. 37, 511

Daughaday, W.H. 1958 b

Binding of corticosteroids by plasma proteins: IV. The electrophoretic demonstration of corticosteroid binding globulin

J. Clin. Invest. 37, 519

Daughaday, W.H. 1960

The binding of corticosteroids by serum proteins in: Hormones in human plasma

Hrsg.: Antoniades, H.N.
Little Brown, Boston, S. 495

De Moor, P.; Steeno, O.; Raskin, M. u. Hendrikx, A. 1960

Fluorimetric determination of free plasma 11-hydroxy-corticosteroids in man

Acta Endocrinol. 33, 297

De Moor,P., Heirwegh, K.; Heremans, J.F. u. Declerck-Raskin, M. 1962

Protein binding of corticoids studied by gel filtration

J. Clin. Invest. 41, 816

De Moor, P.; Steeno, O. u. Deckx, R. 1963

Factors affecting the binding of cortisol by transcortin

Acta Endocrinol. 44, 107

De Moor, P.; Steeno, O.; Brosens, I. u. Hendrickx, A. 1966

Data on transcortin activity in human plasma as studied by gel filtration

J. Clin. Endocrinol. Metab. 26, 71

De Moor, P.; Steeno, O. u. Heyns, W. 1968

Possible role or significance of protein steroid binding in plasma

Ann. Endocrinol. 29, 119

Dirscherl, W. u. Kadib-Elban, B. 1970

Zur Biosynthese von Steroidhormonen; Cholesterin kein obligates Zwischenprodukt

Symp. Dtsch. Ges. Endokrin. 16, 393

Dixon, P.F., Booth, M. u. Butler, J. 1967

The Corticosteroids

in: Hormones in blood

Hrsg. Gray, C.H. u. Bacharach, A.L., Band 2
Academic Press, London u. New York, S. 306

Dixon, R.; Hyman, A.; Gurpide, E.; Dytenfurth, J.; Cohen, H.; Bowe,E.; Engel, T.; Daniel, S.; James, S. u. van de Wiele,R. 1970

Feto-maternal transfer and production of cortisol in the sheep

Steroids 16, 771

Doe, R.P.; Zinneman, H.H.; Flink, E.B. u. Ulstrom, R.A. 1960

Significance of the concentration of nonprotein-bound plasma cortisol in normal subjects, cushing's syndrome, pregnancy, and during estrogen therapy

J. Clin. Endocrinol. Metab. 20, 1484

Doe, R.P.; Fernandez, R. u. Seal, U.S. 1964
Measurement of corticosteroid-binding globulin in man
J. Clin. Endocrinol. Metab. 24, 1029

Dorfman, R.J. u. Ungar, F. 1965
Metabolism of steroid hormones
Academic Press, New York u. London

Drost, M.u. Holm, L.W. 1968
Prolonged gestation in ewes after foetal adrenalectomy
J. Endocrinol. 40, 293

Dusza, J.P.; Heller, M. u. Bernstein, S. 1963
Ultraviolett absorption
in: Physical properties of the steroid hormones
Hrsg.: Engel, L.L.
Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, S.69

Eik-Nes, K.; Schellman, J.A.; Lumry, R. u. Samuels, L.T. 1954
The binding of steroids to protein. I. Solubility determinations
J. Biol. Chem. 206, 411

Elliott, F.H.; Birmingham, M.K.; Schally, A.V. u. Schönbaum, E. 1954
The micro estimation of steroids produced by rat adrenals in vitro
Endocrinology 55, 721

Erlanger, B.F.; Borek, F.; Beiser, S.M. u. Lieberman, S. 1957
Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone
J. Biol. Chem. 228, 713

Estergreen, V.L. Jr.; u. Venkateseshu, G.K. 1967
Positive identification of corticosterone and cortisol in jugular plasma of dairy cattle
Steroids 10, 83

Fraser, R. u. James, V.H.T. 1968

Double isotope assay of aldosterone, corticosterone and cortisol in human peripheral plasma

J. Endocrinol. 40, 59

Gala, R.R. u. Westphal, U. 1965

Corticosteroid-binding globulin in the rat: studies on the sex difference

Endocrinology 77, 841

Ganong, W.F. 1965

Review of medical physiology
2. Auflage

Lange Medical Publications, Los Altos, California

Gardiner, W.L. u. Horning, E.C. 1966

Gas-liquid chromatographic separation of C_{19} and C_{21} human urinary steroids by a new procedure

Biochim. Biophys. Acta, 115, 524

Gassner, F.X.; Martin, R.P.; Shimoda,W. u. Alego, J.W. 1960

Metabolism of radioactive steroid esters in the bovine male and female

Fert. Steril. 11, 49

Gerdes, H. u. Teller, W. 1968

Neue methodische Möglichkeiten zur klinischen Funktionsdiagnostik der Nebennierenrinde. Erfahrungen mit einer gaschromatographischen Methode zur quantitativen Bestimmung freier C_{21} - 17-Hydroxycorticosteroide in Plasma und Harn

Acta Endocrinol. 59, 203

Geigy, J.R. 1962

Wissenschaftliche Tabellen
6. Auflage

Documenta Geigy, Basel

Halliday, R. u. Buttle, H.R.L. 1968

The effects of cortisone acetate on the length of the gestation period and the survival of foetal scottish black face lambs

J. Endocrinol. 41, 447

Hechter, O.; Zaffaroni, A.; Jacobsen, R.P.; Levy, H., Jeanloz, R.W.; Schenker, V. u. Pincus, G. 1951

The nature and the biogenesis of the adrenal secretory product

Rec. Progr. Hormone Res. 6, 215

Heitzman, R.J.; Adams, T.C. u. Hunter, G.D. 1970

The assay of corticosteroids in plasma of the dairy cow

J. Endocrinol. 47, 133

Heitzman, R.J.; Baird, G.D. u. Mather, I. 1970

Plasma corticosteroid levels in normal and ketotic cows

J. Endocrinol. 48, XVI

Hendrickx, G.V. 1962

Investigations on the hormones in udder, lymph and plasma from cattle

Quart. J. Exp. Physiol. 47, 302

Heyns, W.; Van Baelen, H. u. De Moor, P. 1969

Study of the specificity of the steroid binding ß-globulin in human plasma

J. Endocrinol. 43, 67

Hoffmann, B.; Humburg, P. u. Martin, R.P. 1968

Isolation of crystalline nicotinamide from bovine blood

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 967

Hoffmann, B. u. Karg, H. 1970

Determination of progesterone in bovine peripheral plasma by competitive protein binding

Ann. Endocrinol. 31, 823

Hoffmann, W. u. Westphal, U. 1969

Steroid-protein interactions: XXII. Extrapolation technique for determination of corticosteroid-binding globulin by gel filtration

Anal. Biochem. 32, 48

Hoffsis, G.F.; Murdick, P.W.; Tharp, V.L. u. Ault, K. 1970

Plasma concentrations of cortisol and corticosterone in the normal horse

Amer. J. Vet. Res. 31, 1379

Holm, L.W.; Parker, H.R. u. Galligan, S.J. 1961

Adrenal insufficiency in postmature holstein calves

Amer. J. Obstet. Gynecol. 81, 1000

Jöchle, W.; Orozco, L.P.; Zerobin, K.; Esparza, H. u. Hidalgo,M.A. 1971

Hormonal effects on parturition in pigs: Effects of a corticoid and a progestin on parturition in pigs

im Druck

Johansson, E.D.B.; Neill, J.D. u. Knobil, E. 1968

Periovulatory progesterone concentration in the peripheral plasma of the rhesus monkey with a methodologic note on the detection of ovulation

Endocrinology 82, 143

Johansson, E.D.B. 1970

A simplified procedure for the assay of progesterone in: Steroid assay by protein binding

Hrsg.: Diczfalusy, E.
Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, Stockholm, S. 188

Junkmann, K. 1961

Pharmakologie

Naunyn-Schmied. Arch. Pharmakol. 241,55

Junkmann, K. u. Witzel, H. 1963
Chemie und Pharmakologie der Corticoide
Z.Vitamin-, Hormon-, Ferment-Forschung 13, 49

Karg, H. 1955
Das Verhalten der Bluteosinophilen als Belastungsprobe bei Rind und Schwein
Zentralblatt für Veterinärmedizin 2, 682

Karg, H. 1968
Endokrine Regelkreise der Fortpflanzung und deren willkürliche Steuerung
Zeitschr. Tierzücht. Züchtungsbiol. 84, 262

Karg, H. 1969
Hormonale Regulation
in: Handbuch der Tierernährung
Band 1
Hrsg.: v. Lenkeit, W.; Beirem, K. u. Crasemann,E.
Verlag P. Parey, Hamburg - Berlin, S. 362

Karg, H.; Böhm, S.; Günzler, O. u. Müller, S. 1971
Erfahrungen über die Geburtseinleitung beim Rind mit Glucocorticoiden
Dtsch. tierärztl. Wschr. 78, 35

Karlson, P. 1970
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
7. Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Kelly, R.W. 1969a
The gaschromatography of some new silyl derivates of cortisone, cortisol and related compounds
Steroids 13, 507

Kelly, R.W. 1969 b
Dimethyldiacetoxy silane as a silylating reagent. A new technique for forming siliconides of corticosteroid
J. Chromatogr. 43, 229

Kolb, E. 1967

Lehrbuch der Physiologie der Haustiere
2. Auflage

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Kornel, L.; Moore, J.T. u. Noyes, J.; 1970

Corticosteroids in human blood: IV. Distribution of cortisol and its metabolites between plasma and erythrocytes in vivo

J. Clin. Endocrinol. Metab. 30, 40

Kuschinsky, G. u. Lüllmann, H. 1967

Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie
3. Auflage

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

L'Age, M. u. Gonzalez-Luque, A. 1970

Hemmung der durch intrahypophysäre Infusion von Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF) oder von Lysin-Vasopressin (LVP) stimulierten ACTH-Sekretion durch Dexamethason am nicht narkotisierten Hund

Symp. Dtsch. Ges. Endokrin. 16, 286

Lebeau, M.C. u. Baulieu, E.E. 1970

Binding of steroid conjugates to human corticosteroid binding globulin

J. Clin. Endocrinol. Metab. 30, 166

Liggins, G.C.; Kennedy, P.C. u. Holm, L.W. 1967

Failure of initiation of parturition after electrocoagulation of the pituitary of the foetal lamb

Amer. J. Obstet. Gynecol. 98, 1080

Liggins, G.C. 1968

Premature parturition after infusion of corticotrophins or cortisol into foetal lambs

J. Endocrinol. 42, 323

Liggins, G.C. 1969

Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids

J. Endocrinol. 45, 515

Lindner, H.R. 1964

Comparative aspects of cortisol transport: Lack of firm binding to plasma proteins in domestic ruminants

J. Endocrinol. 28, 301

Lipsett, M.B.; Doerr, P. u. Bermudez, J.A. 1970

Saturation assays for plasma progesterone and 17-hydroxyprogesterone
in: Steroid assay by protein binding

Hrsg.: Diczfalusy, E. Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology. Stockholm, S. 155

Lommer, D. 1970

In vitro Untersuchungen über die Biosynthese der Corticosteroide und die Wirkung des ACTH

Symp. Dtsch. Ges. Endokrin. 16, 8

Maickel, R.P.; Miller, F.P. u. Brodie, B.B. 1969

Interaction of non-steroidal antiinflammatory agents with corticosterone. Binding to plasma proteins in the rat

Arzneimittelforschung 19, 1803

März, E. 1971

Bestimmung von Progesteron im peripheren Rinderblut während verschiedener Phasen der Trächtigkeit

Med. vet. Diss. München

McDonald, L.E. 1969

Veterinary endocrinology and reproduction

Lea & Febiger, Philadelphia

Mercier, C.; Alfsen, A. u. Baulieu, E.E. 1966

A testosterone binding globulin

Excerpta Med. International Congress Series 101, 212

Mercier-Bodard, C.; Alfsen, A. u. Baulieu, E.E. 1970

Sex steroid binding plasma protein (SBP)
in: Steroid assay by protein binding
Hrsg.: Diczfalusy, E.
Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, Stockholm, S. 204

Meyer, A.S. u. Lindberg, M.C. 1955

Optical-analytical studies on steroids. Reducing characteristics of hydroxylated and ketonic steroids toward blue tetrazolium

Ann. Chem. 27, 813

Midgley, A.R. Jr. u. Niswender, G.D. 1970

Radioimmunoassay of steroids
in: Steroid assay by protein binding

Hrsg.: Diczfalusy, E.
Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, Stockholm, S. 320

Migeon, C.J.; Lawrence, B.; Bertrand, J. u. Holman, G.H. 1959

In vivo distribution of some 17-hydroxycorticosteroids between the plasma and red blood cells of man

J. Clin. Endocrinol. Metab. 19, 1411

Milic, A.G. u. Adamson, K. 1969

Relationship between anencephaly and prolonged pregnancy

J. Ostet. Gynecol. 76, 102

Mills, I.H.; Chen, P.S. Jr. u. Bartter, F.C. 1959

The protein-binding of steroids as studied by ultrafiltration

J. Endocrinol. 18, 3

Mills, I.H.; Schedl, H.P.; Chen, P.S. u. Bartter, F.C. 1960

The effekt of oestrogen administration on the metabolism and protein binding of hydrocortisone

J. Clin. Endocrinol. Metab. 20, 515

Mills, I.H. 1962

Transport and metabolism of steroids

Brit. Med. Bull. 18, 127

Murphy, B.E.P.; Engelberg, W. u. Pattee, C.I. 1963

Simple method for the determination of plasma corticoids

J. Clin. Endocrinol. Metab. 23, 293

Murphy, B.E. P. 1964

Application of the property of protein-binding to the assay of minute quantities of hormones and other substances

Nature 201, 679

Murphy, B.E.P. u. Pattee, C.I. 1964

Determination of plasma corticoids by competitive protein-binding analysis using gel filtration

J. Clin. Endocrinol. Metab. 24, 919

Murphy, B.E.P. 1967 a

Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassay

J. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 973

Murphy, B.E.P. 1967 b

Studies of the protein-binding of testosterone and estrogens in human plasma

Abstracts of 49th Meeting of the Endocrine Society, no.110

Murphy, B.E.P. 1969

Protein binding and the assay of nonantigenic hormones

Rec. Progr. Hormone Res. 25, 563

Murphy, B.E.P. 1970 a

Methodological problems in competitive protein-binding techniques; the use of sephadex column chromatography to separate steroids
in: Steroid assay by protein binding
Hrsg.: Diczfalusy, E.
Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, Stockholm, S. 37

Murphy, B.E.P. 1970 b

in der Diskussion von: Slaunwhite, W.R. Jr. u. Sandberg, A.A.

Analysis of corticosteroids
in: Steroid assay by protein binding

Hrsg.: Diczfalusy, E.
Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, Stockholm, S. 153

Neill, J.D.; Johansson, E.D.B.; Datta, J.K. u. Knobil, E. 1967

Relationship between the plasma levels of luteinizing hormone and progesterone during the normal menstrual cycle

J. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 1167

Nelson, D.H. u. Samuels, L.T. 1952

A method for the determination of 17-hydroxycorticosteroids in blood: 17-Hydroxycorticosterone in the peripheral circulation

J. Clin. Endocrinol. Metab. 12, 519

Nugent, C.A. u. Mayes, D.M. 1966

Plasma corticosteroids determined by use of corticosteroid-binding globulin and dextran-coated charcoal

J. Clin. Endocrinol. Metab. 26, 1116

Osinga, A. 1969

De "foeto-placental unit" en het geboorteproces

Tijdschr. Diergeneesk. 94, 768

Paterson, J.Y.R. 1957

17-Hydroxycorticosteroids and leucocytes in the blood of dairy cattle

J. Comp. Pathol. 67, 165

Paterson, J.Y.F. 1964

The distribution and turnover of cortisol in sheep

J. Endocrinol. 28, 183

Paterson, J.Y.F. u. Hills, F. 1967

The binding of cortisol by ovine plasma proteins

J. Endocrinol. 37, 261

Péron, F.C. 1962

Adrenocorticosteroids
in: Methods in hormone research
Band 1

Hrsg.: Dorfman, R.I.
Academic Press, New York und London, S. 199

Peterson, R.E.; Karrer,A. u. Guerra, S.L. 1957

Evaluation of Silber-Porter procedure for determination of plasma hydrocortisone

Ann. Chem. 29, 144

Porter, C.C. u. Silber, R.H. 1950

A quantitative color reaction for cortisone and related 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids

J. Biol. Chem. 185, 201

Racadot, P.A.; Trouvé, M.; Biserte, G. u. Linquette, M. 1969

Dosage de la capacité de liaison du cortisol sur les protéines plasmatiques (transcortine) par filtration sur gel "sephadex"

Ann. Biol. Clin. 27, 181

Rea, C. 1898

Prolonged gestation, acrania monstrosity and apparent placenta praevia in one obstetrical case

J. Amer. Med. Ass. 30, 1166

Reichstein, T. 1937

Über Bestandteile der Nebennieren-Rinde. X. Zur Kenntnis des Corticosterons

Helv. Chim. Acta 20, 953

Riegle, G.D. u. Nellor, J.E. 1967

Changes in adrenocortical function during aging in cattle

J. Gerontol. 22, 83

Robertson, W.G. u. Mixner, I.P. 1956

Chemical determinations of 17-hydroxycorticosteroids in the blood of cattle and some indications of its physiological significance

J. Dairy Sci. 39, 589

Rosenbaum, W.; Christy, N.P. u. Kelly, W.G. 1966

Electrophoretic evidence for the presence of an estradiol-binding ß-globulin in human plasma

J. Clin. Endocrinol. Metab. 26, 1399

Rosenthal, H.E.; Slaunwhite, R.W.Jr. u. Sandberg, A.A. 1969

Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. X. Cortisol and progesterone interplay and unbound levels of these steroids in pregnancy

J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 352

Saba, N. 1964

The estimation of cortisol and cortisone in bovine and ovine plasma

J. Endocrinol. 28, 139

Samuels, L.T. 1966

The dynamics of steroid hormone distribution in the body, particularly the distribution of cortisol
in: Steroid dynamics

Hrsg.: Pincus, G.; Nakao, T. u. Tait, J.F.
Academic Press, New York und London, S. 385

Sandberg, A.A. u. Slaunwhite, W.R.Jr. 1959

Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. II. Levels in various conditions and the effects of estrogens

J. Clin. Invest. 38, 1290

Sandberg, A.A. u. Slaunwhite, W.R. Jr. 1963

Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. V. In vitro inhibition of cortisol metabolism

J. Clin. Invest. 42, 51

Sandberg, A.A.; Rosenthal, H.; Schneider, S.L. u. Slaunwhite, W.R.Jr. 1966

Protein-steroid interactions and their role in the transport and metabolism of steroids
in: Steroid dynamics

Hrsg.: Pincus, G.; Nakao, T. u. Tait, J.F.
Academic Press, New York und London, S. 1

Seal, U.S. u. Doe, R.P. 1961

Purification and properties of "transcortin", the corticosteroid-binding globulin

Fed. Proc. 20, 179

Seal, U.S. u. Doe, R.P. 1962

Corticosteroid-binding globulin. I. Isolation from plasma of diethylstilbestrol-treated men

J. Biol. Chem. 237, 3136

Seal, U.S. u. Doe, R.P. 1966

Corticosteroid-binding globulin: biochemistry, physiologie, and phylogenie
in: Steroid dynamics

Hrsg.: Pincus, G.; Nakao, T. u. Tait, J.F.
Academic Press, New York und London, S. 63

Shaw, K.E.; Dutta, S. u. Nichols, R.E. 1960

Quantities of 17-hydroxycorticosteroids in the plasma of healthy cattle during various physiological states

Amer. J. Vet. Res. 21, 52

Shaw, K.E. u. Nichols, R.E. 1962

The influence of age upon the circulatory 17-hydroxy-corticosteroids of cattle subjected to blood sampling and exogenous adrenocorticotropic hormone and hydrocortisone

Amer. J. Vet. Res. 23, 1217

Shaw, K.E. u. Nichols, R.E. 1963

The influence of frequent blood sampling of calves upon their response to exogenous adrenocorticotropic hormone

Amer. J. Vet. Res. 24, 565

Silber, R.H. u. Porter, C.C. 1954

The determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma

J. Biol. Chem. 210, 923

Silber, R.H. u. Porter, C.C. 1957

Determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma

Methods Biochem. Anal. 4, 139

Skinner, J.D.; van Blom, P.A.; Gouws, D.J. u. Jöchle, W. 1970
The effect of shortening gestation length with flumethasone on pelt quality of karakul lambs
Proc. S. Afr. Soc. Anim. Prod. 9, 193

Skinner, J.D.; Jöchle, W. und Nel, J.W. 1970
Induction of parturition in karakul and cressbred ewes with flumethasone
Agroanimalia (South Africa) 2, 2

Slaunwhite, W.R. Jr. und Sandberg, A.A. 1959
Transcortin, a corticosteroid-binding protein of plasma
J. Clin. Invest. 38, 384

Slaunwhite, W.R.Jr.; Lockie, G.N.; Back, N. und Sandberg, A.A. 1962
Inactivity in vivo of transcortin-bound cortisol
Science 135, 1065

Slaunwhite, W.R.Jr. u. Sandberg, A.A. 1970
Analysis of corticosteroids
in: Steroid assay by protein binding
Hrsg.: Diczfalusy, E.
Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, Stockholm, S. 144

Steeno, O.; Heyns, W.; van Baelen, H. u. De Moor, P. 1968
Testosterone binding in human plasma
Ann. Endocrinol. 29, 141

Tait, J.F. u. Burstein, S. 1964
In vivo studies of steroid dynamics in man
in: The hormones
Band 5
Hrsg.: Pincus, G.; Thimann, K.V. u. Astwood, E.B.
Academic Press, New York und London

Thorn, G.W.; Forsham, P.H.; Prunty, F.T.G. u. Hills, A.G. 1948
A test for adrenal cortical insufficiency: The response to pituitary adrenocorticotropic hormone
J. Amer. Med. Ass. 137, 1005

Touchstone, J.C. u. Hsu, C.T. 1955

Determination of α-ketolic substances in urinary extracts

Ann. Chem. 27, 1517

Trapp, G.A. u. West, C.D. 1969

Determination of corticosteroid binding proteins by an adsorption method

J. Lab. Clin. Med. 73, 861

Turner, C.D. 1966

Generall endocrinolgy
4. Auflage

W.B. Saunders Comp., Philadelphia, London

Uettwiller, A. u. Keller, M. 1968

Eine direkte, fluorimetrische, quantitative, dünnschichtchromatographische Routinemethode zur Bestimmung von freiem Cortisol, Cortison, Corticosteron und Compound S im Plasma

J. Chromatogr. 35, 526

von Baelen, H.; Heyns, W.; Schonne, E. u. De Moor, P. 1968

An estradiol binding globulin in human serum: Partial purification

Ann. Endocrinol. 29, 153

Vanden Heuvel, W.I.A. u. Horning, E.C. 1960

Gaschromatography of adrenal cortical steroid hormones

Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 356

Van Heerden, K.M. 1963

Investigations into the cause of abortions in angora goats in South Africa

Onderstepoort J. Vet. Res. 30, 23

Van Rensburg, S.J. 1963

Endocrinological aspects of habitually aborting angora goat ewes

S. Afr. Med. J. 37, 1114

Van Rensburg, S.J. 1965

Adrenal function and fertility

J. S. Afr. Vet. Med. Ass. 36, 491

Van Rensburg, S.J. 1966

Gestation in sheep after foetal adrenalectomy and cortisol acetate administration

J. Endocrinol. 38, 83

Venkataseshu, G.K. u. Estergreen, V.L.Jr. 1970

Cortisol and corticosterone in bovine plasma and the effekt of adrenocorticotropin

J. Dairy Sci. 53, 480

Vermeulen, A. 1961

Role of the erythrocytes in transport and metabolism of 4-^{14}C-cortisol

Acta Endocrinol. 37, 348

Vermeulen, A. u. Verdonck, L. 1970

Testosterone assays by competitive protein binding in: Steroid assay by protein binding

Hrsg.: Diczfalusy, E.
Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, Stockholm, S. 239

Wagner, W.C. 1970

Plasma corticoids in the cow

J. Anim. Sci. 31, 233

Westphal, U.; Firschein, H.E. u. Pearce, E.M. 1955

Binding of hydrocortisone-4-C^{14} and progesterone-4-C^{14} to serum albumin, demonstrated by paper electrophoresis

Science 121, 601

Westphal, U. 1970

Preparation and characteristics of corticosteroid-binding globulin (CBG, transcortin)
in: Steroid assay by protein binding
Hrsg.: Diczfalusy,E.
Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, Stockholm, S. 122

Whipp, S.C.; Weber, A.F.; Ursenik, E.A. u. Good, A.L. 1967
Rates of hydrocortisone and corticosterone secretion in calves
Amer. J. Vet. Res. 28, 671

Whipp, S.C. u. Lyon, N.C. 1970
Hydrocortisone determination in bovine plasma
Cornell Vet. 60, 582

Zander, J. u.Simmer, H.
Die chemische Bestimmung von Progesteron in organischen Substraten
Klin. Wochenschr. 32, 529

Zimmermann, W. 1935
Eine Farbreaktion der Sexualhormone und ihre Anwendung zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung
Z. phys. Chem. 233, 257

Herrn Prof.Dr. Heinrich Karg gilt mein besonderer Dank für die freundliche Überlassung des Themas, seine wissenschaftlichen Anregungen, sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Bernd Hoffmann für die methodische Einarbeitung und die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen.

Lebenslauf

Am 28. November 1941 wurde ich, Eduard Jordan, als Sohn des Kaufmanns Josef Jordan und seiner Ehefrau Katharina, geb. Götz, in Freising geboren.

Nach 5 Jahren Volksschule in Freising besuchte ich ab 1953 das Humanistische Gymnasium in Tegernsee und später das Domgymnasium in Freising, wo ich 1962 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend studierte ich zwei Semester Physik an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich. Um die Voraussetzung zum Studium der Landwirtschaft zu erwerben, leistete ich 1963/64 ein 15 monatiges landwirtschaftliches Praktikum ab, das ich mit der Gehilfenprüfung abschloß. Im November 1964 begann ich das Studium der Landwirtschaft an der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Universität München in Weihenstephan. Nach zwei Semestern und dem Ablegen der Vordiplomprüfung in Weihenstephan immatrikulierte ich mich im Herbst 1965 an der Fakultät für Tiermedizin der Universität München. Im Dezember 1969 wurde mir nach dem Bestehen der tierärztlichen Prüfung die Bestallung als Tierarzt erteilt.

Die Arbeiten zu vorliegender Dissertation wurden im Jahre 1967 am Institut für Physiologie der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Weihenstephan begonnen und nach zahlreichen, durch das Studium bedingten Unterbrechungen im April 1971 abgeschlossen.